

# OLIGONUCLEOTIDE ANALOGUES

Publication number: JP2002521310T

Publication date: 2002-07-16

Inventor:

Applicant:

Classification:

- international: C12N15/09; A61K31/7042; A61K31/7052;  
A61K31/7064; A61K31/7072; A61K31/7076;  
A61K31/7088; A61K31/712; A61K48/00; A61P31/12;  
A61P35/00; C07D491/08; C07D493/04; C07D493/08;  
C07F7/18; C07F9/6558; C07H19/06; C07H19/16;  
C07H21/00; C12Q1/68; C12N15/09; A61K31/7042;  
A61K31/7088; A61K31/712; A61K48/00; A61P31/00;  
A61P35/00; C07D491/00; C07D493/00; C07F7/00;  
C07F9/00; C07H19/00; C07H21/00; C12Q1/68; (IPC1-  
7): C07F9/6558; A61K31/712; A61K48/00; A61P31/12;  
A61P35/00; C07D491/08; C07D493/04; C07D493/08;  
C07F7/18; C07H19/06; C07H19/16; C07H21/00;  
C12N15/09; C12Q1/68

- European: C07H21/00C4

Application number: JP20000511775T 19980914

Priority number(s): DK19970001054 19970912; DK19980000585 19980429;  
DK19970001492 19971219; DK19980000061 19980116;  
DK19980000286 19980303; DK19980000750 19980608;  
DK19980000982 19980728; WO1998DK00393  
19980914; US19980088309P 19980605

Also published as:

WO9914226 (A3)  
WO9914226 (A2)  
EP1015469 (A3)  
EP1015469 (A2)  
JP2007211025 (A)

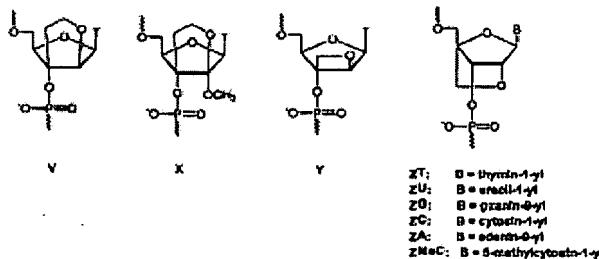
more >>

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP2002521310T

Abstract of corresponding document: **WO9914226**

The present invention relates to novel bicyclic and tricyclic nucleoside and nucleotide analogues as well as to oligonucleotides comprising such elements. The nucleotide analogues, LNAs (<u>L</u>ocked <u>N</u>ucleoside <u>A</u>nalogues), are able to provide valuable improvements to oligonucleotides with respect to affinity and specificity towards complementary RNA and DNA oligomers. The novel type of LNA modified oligonucleotides, as well as the LNAs as such, are useful in a wide range of diagnostic applications as well as therapeutic applications. Among these can be mentioned antisense applications, PCR applications, strand displacement oligomers, as substrates for nucleic acid polymerases, as nucleotide based drugs, etc. The present invention also relates to such applications.



(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-521310

(P2002-521310A)

(43)公表日 平成14年7月16日(2002.7.16)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト <sup>*</sup> (参考)
C 0 7 F	9/6558	C 0 7 F	4 B 0 2 4
A 6 1 K	31/712	A 6 1 K	4 B 0 6 3
	48/00		4 C 0 5 7
A 6 1 P	31/12	A 6 1 P	4 C 0 7 1
	35/00		4 C 0 8 4

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全337頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2000-511775(P2000-511775)
(86) (22)出願日	平成10年9月14日(1998.9.14)
(85)翻訳文提出日	平成12年3月13日(2000.3.13)
(86)国際出願番号	PCT/DK98/00393
(87)国際公開番号	WO99/14226
(87)国際公開日	平成11年3月25日(1999.3.25)
(31)優先権主張番号	1054/97
(32)優先日	平成9年9月12日(1997.9.12)
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)
(31)優先権主張番号	1492/97
(32)優先日	平成9年12月19日(1997.12.19)
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)

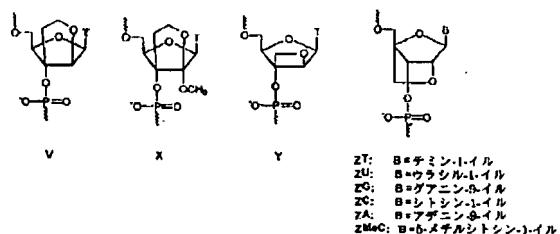
(71)出願人	エクシコン エ/エス EXIQON A/S デンマーク、ヴェドベク ディーケー- 2950、ビグストゥッペン 9
(72)発明者	ヴェンゲル、イエスパー デンマーク、オデンセ エス. ディーケー- -5260、ルグマーケン 48
(72)発明者	ニルセン、ポール デンマーク、グリンステッド ディーケー- -7200、エルメヴァンゲン 6
(74)代理人	弁理士 野河 信太郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】オリゴヌクレオチド類似体

(57)【要約】

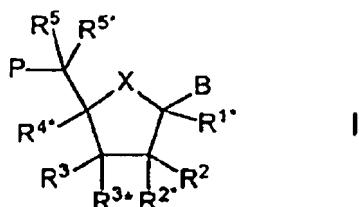
この発明は、新規な2環式および3環式ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体ならびにそのような成分からなるオリゴヌクレオチドに関する。ヌクレオチド類似体、LNA(ロックされたヌクレオシド類似体)、は、相補的なRNAおよびDNAオリゴマーに対する親和性および特異性に関して、オリゴヌクレオチドに価値ある向上をもたらすことができる。新規なタイプのLNA修飾オリゴヌクレオチド、ならびにLNA自体は、診断適用ならびに治療適用の広い範囲において、有用である。これらのうち、アンチセンス適用、PCR適用、鎖置換オリゴマー、核酸ポリメラーゼの基質として、ヌクレオチドベースの医薬として等が挙げられる。この発明はまた、そのような適用についている。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】 一般式 I

## 【化1】



[式中、Xは、-O-、-S-、-N(R<sup>n</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-、-O-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-O-、-S-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-S-、-N(R<sup>n</sup>)-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-N(R<sup>n</sup>)-および-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup>)-から選択され；

Bは、水素、ヒドロキシ、任意に置換されたC<sub>1-4</sub>-アルコキシ、任意に置換されたC<sub>1-4</sub>-アルキル、任意に置換されたC<sub>1-4</sub>-アシルオキシ、核塩基、DNAインターラーカー、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され；

Pは、継続するモノマーへのヌクレオシド間結合のためのラジカル位置または5'-末端基を意味し、そのようなヌクレオシド間結合または5'-末端基は任意に置換基R<sup>5</sup>を含有し；

置換基R<sup>2</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>3</sup>の1つは、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または3'-末端基を意味する基P'であり；

R<sup>1</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>n</sup>の存在する置換基から選択される非ジェミナル置換基ならびにP'を意味しないR<sup>2</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>3</sup>の存在する置換基から選択される非ジェミナル置換基の1または2の対は、各々、-C(R<sup>a</sup>R<sup>b</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=C(R<sup>a</sup>)-、-C(R<sup>a</sup>)=N-、-O-、-Si(R<sup>a</sup>)<sub>2</sub>-、-S-、-SO<sub>2</sub>-、-N(R<sup>a</sup>)-および>C=Z [式中、Zは-O-、-S-および-N(R<sup>a</sup>)-から選択され、かつR<sup>a</sup>およびR<sup>b</sup>は各々独立して、水素、任意に置換されたC<sub>1-12</sub>-アルキル、任意に置換されたC<sub>2-12</sub>-アルケニル、任意に置換されたC<sub>2-12</sub>-アルキニル、ヒドロキシ、C<sub>1-12</sub>-アルコキシ、C<sub>2-12</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-12</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-12</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ

-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノ-カルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、 $C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは任意に置換されていてもよく、ここで2つのジェミナル置換基  $R^a$  および  $R^b$  は、一緒になって任意に置換されたメチレン (=CH<sub>2</sub>)を意味してもよく、ここで  $R^a$ 、 $R^b$  ならびに存在していて P、P' またはビラジカル(類)に含まれていない置換基  $R^1$ °、 $R^2$ 、 $R^2$ °、 $R^3$ 、 $R^3$ °、 $R^4$ °、 $R^5$ 、 $R^5$ °、 $R^6$  および  $R^6$ °、 $R^7$  および  $R^7$ ° のいずれかから選択される2つの非ジェミナルなまたはジェミナル置換基は、一緒になって上記と同じ種類のビラジカル類から選択された結合したビラジカルを形成してもよい] から選択される1-8の基/原子からなるビラジカルを意味し;

非ジェミナル置換基の該対は、それにより(i)該非ジェミナル置換基が結合している原子および(ii)いずれかの介在原子と一緒にになって单環式または2環式のものを形成し;かつ

存在していて P、P' またはビラジカルに含まれていない置換基  $R^1$ °、 $R^2$ 、 $R^2$ °、 $R^3$ 、 $R^4$ °、 $R^5$ 、 $R^5$ °、 $R^6$  ならびに  $R^6$ °、 $R^7$  および  $R^7$ ° の各々は、水素、任意に置換された  $C_{1-12}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルキニル、ヒドロキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシ、 $C_{2-12}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-12}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ-カルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシ-カルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノ-カルボニル、ア

ミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、 $C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは任意に置換されていてもよく、ここで2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソ、チオキソ、イミノまたは任意に置換されたメチレンを意味してもよく、または任意に -O-、-S- および -(NR<sup>n</sup>)- から選択される1以上のヘテロ原子/基によって割り込まれかつ/または末尾をなしている1~5の炭素原子アルキレン鎖からなるスピロビラジカルを一緒になって形成してもよく、ここで R<sup>n</sup> は水素および $C_{1-4}$ -アルキルから選択され、かつここで2つの隣接した(非ジェミナルな)置換基は二重結合を生じる付加的な結合を意味し;かつ R<sup>n\*</sup> は存在するがビラジカル中に含有されないとき、水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択され;ただし、

- (i) LNA が2環式ヌクレオシド類似体であるとき、R<sup>2</sup> および R<sup>3</sup> は一緒になって -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- および -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- から選択されるビラジカルを意味せず;
- (ii) LNA が2環式 ヌクレオシド類似体であるとき、R<sup>3</sup> および R<sup>5</sup> は一緒になって -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>- から選択されるビラジカルを意味せず;
- (iii) LNA が3環式ヌクレオシド類似体であるとき、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup> および R<sup>5\*</sup> は一緒になってトリラジカル -CH<sub>2</sub>-CH(-)-CH<sub>2</sub>- を意味せず;
- (iv) LNA が2環式ヌクレオシド類似体であるとき、R<sup>1\*</sup> および R<sup>6\*</sup> は一緒になってビラジカル -CH<sub>2</sub>- を意味せず;かつ
- (v) LNA が2環式ヌクレオシド類似体であるとき、R<sup>4\*</sup> および R<sup>6\*</sup> は一緒になつてビラジカル -CH<sub>2</sub>- を意味しない]

のヌクレオシド類似体(以後、「LNA」と称する)ならびにその塩基性塩および酸付加塩の少なくとも一つからなるオリゴマー(以後、「LNA修飾オリゴヌクレオチド」と称する)。

**【請求項2】** それぞれ1または2のビラジカルを構成する、非ジェミナル置換基の1または2の対が、 $R^1^\circ$ 、 $R^4^\circ$ 、 $R^6$ 、 $R^6^\circ$ 、 $R^7$ 、 $R^7^\circ$ 、 $R^8^\circ$  の存在する置換基および  $P^\circ$  を意味しない  $R^2$ 、 $R^2^\circ$ 、 $R^3$ 、および  $R^3^\circ$  の存在する置換基から選択される請求項1のオリゴマー。

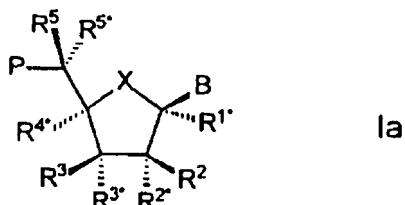
**【請求項3】** 1~10000の一般式IのLNAおよび天然に存在するヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体から選択される0~10000のヌクレオシドからなり、ただしヌクレオシドの数およびLNAの数の合計は少なくとも2、好ましくは少なくとも3である、例えば2~15000の範囲である、請求項1または2のオリゴマー。

**【請求項4】** 少なくとも1つのLNAが、置換基Bのような核塩基からなる、請求項3のオリゴマー。

**【請求項5】** 置換基  $R^3$  および  $R^3^\circ$  の1つが  $P^\circ$  を意味する請求項1~4のいずれかのオリゴマー。

**【請求項6】** LNAが以下の式I a

【化2】



[式中、P、 $P^\circ$ 、B、X、 $R^1^\circ$ 、 $R^2$ 、 $R^2^\circ$ 、 $R^3$ 、 $R^3^\circ$ 、 $R^4^\circ$ 、 $R^5$  および  $R^5^\circ$  は、請求項1~5で定義したとおりである] を有する請求項1~5のいずれかのオリゴマー。

**【請求項7】**  $R^3^\circ$  が  $P^\circ$  を意味する請求項6のオリゴマー。

**【請求項8】** 1対の(2つの)非ジェミナル置換基からなる1つのビラジカルからなる請求項1~7のいずれかのオリゴマー。

**【請求項9】** Xが $-(CR^6R^{6^\circ})-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ および $-N(R^{8^\circ})-$ から選択され、好ましくは $-O-$ 、 $-S-$ および $-N(R^{8^\circ})-$ から選択され、特に $-O-$ である請求項1~8のいずれかのオリゴマー。

**【請求項10】** 対の非ジェミナル置換基からなるビラジカル(類)が、 $-(CR$

$^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-Y-$ 、 $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$ 、 $-Y-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-Y-$ 、 $-Y-Y-$  [ここで、各 Y は  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Si(R^*)_2-$ 、 $-N(R^*)-$ 、 $>C=O$ 、 $-C(=O)-N(R^*)-$  および  $-N(R^*)-C(=O)-$  から独立して選択され、各  $R^*$  は、水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、および/または 2 つの隣接した(非ジェミナルな)  $R^*$  は一緒になって二重結合を意味してもよく、かつ r および s の各々は 0~4 である、ただし  $r+s$  の合計は 1~5 である] から選択される請求項 1~9 のオリゴマー。

【請求項 11】 各ビラジカルが、 $-Y-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$  [ここで、r および s の各々は 0~3 である、ただし  $r+s$  の合計は 1~4 である] から独立して選択される請求項 10 のオリゴマー。

【請求項 12】 (i)  $R^2^*$  および  $R^4^*$  が一緒になって、 $-Y-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-$  および  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し；

(ii)  $R^2$  および  $R^3$  が一緒になって、 $-Y-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し；

(iii)  $R^2^*$  および  $R^3$  が一緒になって、 $-Y-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し；

(iv)  $R^3$  および  $R^4^*$  が一緒になって、 $-Y-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し；

(v)  $R^3$  および  $R^5$  が一緒になって、 $-Y'-$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し；

(vi)  $R^1^*$  および  $R^4^*$  が一緒になって  $-Y'$ 、 $-(CR^*R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^*R^*)_r-Y-(CR^*R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^*R^*)_{r+s}-NR^*-$  から選択されるビラジカルを意味し；または

(vii)  $R^1$  および  $R^2$  が一緒になって、 $-Y_- - (CR^* R^*)_{r+s} - - (CR^* R^*)_r - Y - (CR^* R^*)_s -$  および  $-Y - (CR^* R^*)_{r+s} - Y_-$  から選択されるピラジカルを意味する；

[ここで、 $r$  および  $s$  の各々は 0~3 である、ただし  $r+s$  の合計は 1~4 であり、かつ  $Y'$  は  $-NR^* - C(=O) -$  および  $-C(=O) - NR^* -$  から選択される]

請求項 11 のオリゴマー。

【請求項 13】 以下の特徴：

(i)  $R^2$  および  $R^4$  が一緒になって、 $-O_- - S_- - N(R^*) - - (CR^* R^*)_{r+s+1} - - (CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s - - O - (CR^* R^*)_{r+s} - O_- - S - (CR^* R^*)_{r+s} - O_- - O - (CR^* R^*)_{r+s} - S_- - N(R^*) - (CR^* R^*)_{r+s} - O_- - O - (CR^* R^*)_{r+s} - N(R^*) - - S - (CR^* R^*)_{r+s} - S_- - N(R^*) - (CR^* R^*)_{r+s} - N(R^*) - (CR^* R^*)_{r+s} - S_- および -S - (CR^* R^*)_{r+s} - N(R^*) -$  から選択されるピラジカルを意味し；

(ii)  $R^2$  および  $R^3$  が一緒になって、 $-O_- - (CR^* R^*)_{r+s} - - (CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $- (CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるピラジカルを意味し；

(iii)  $R^2$  および  $R^3$  が一緒になって、 $-O_- - (CR^* R^*)_{r+s} - - (CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $- (CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるピラジカルを意味し；

(iv)  $R^3$  および  $R^4$  が一緒になって、 $- (CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $- (CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるピラジカルを意味し；

(v)  $R^3$  および  $R^5$  が一緒になって、 $- (CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $- (CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるピラジカルを意味し；または

(vi)  $R^1$  および  $R^4$  が一緒になって、 $- (CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $- (CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるピラジカルを意味し；

(vii)  $R^1$  および  $R^2$  が一緒になって、 $- (CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s - - (CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $- (CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるピラジカルを意

味する；

[ここで、 $r$  および  $s$  の各々は 0~3 である、ただし  $r+s$  の合計は 1~4 であり、かつ  $X$  は  $-O-$ 、 $-S-$  および  $-N(R^i)-$  [ここで、 $R^i$  は水素または  $C_{1-4}$ -アルキルを意味する] から選択される]

の一つが少なくとも 1 つの LNA に適用できる、請求項 12 のオリゴマー。

【請求項 14】  $R^3$  が  $P^*$  を意味する請求項 13 のオリゴマー。

【請求項 15】  $R^2$  および  $R^4$  は一緒になってビラジカルを意味する請求項 14 のオリゴマー。

【請求項 16】  $X$  が 0 であり、 $R^2$  が水素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、かつ  $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^5$  および  $R^6$  は水素を意味する請求項 15 のオリゴマー。

【請求項 17】 ビラジカルが  $-O-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-$   
 $-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{0-1}-N(R^i)-(CH_2)_{1-3}-$  から選択される請求項 16 のオリゴマー。

【請求項 18】 ビラジカルが  $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$  および  $-N(R^i)-CH_2-$  から選択される請求項 17 のオリゴマー。

【請求項 19】  $B$  が核塩基から選択される請求項 15 ~ 18 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 20】 オリゴマーが少なくとも 1 つの LNA [ここで、 $B$  がアデニンおよびグアニンから選択される] および少なくとも 1 つの LNA [ここで、 $B$  がチミン、シトシンおよびウラシルから選択される] からなる請求項 19 のオリゴマー。

【請求項 21】 ビラジカルが  $-(CH_2)_{2-4}-$  である請求項 16 のオリゴマー。

【請求項 22】  $R^2$  および  $R^3$  が一緒になって、ビラジカルを意味する請求項 14 のオリゴマー。

【請求項 23】  $X$  が 0 であり、 $R^2$  が水素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、かつ  $R^1$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^6$  が水素を意味する請求項 22 のオリゴマー。

【請求項24】 ビラジカルが $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{O}-(\text{CH}_2)_{1-3}-$ である請求項23のオリゴマー。

【請求項25】 ビラジカルが $-(\text{CH}_2)_{1-4}-$ である請求項23のオリゴマー。

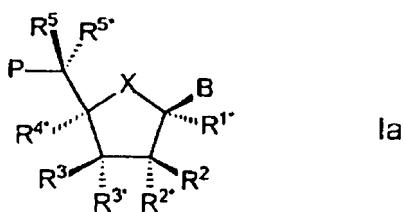
【請求項26】 1つのR<sup>°</sup>が水素、ヒドロキシ、任意に置換されたC<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換されたC<sub>1-6</sub>-アルキル、DNAインターラーティー、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、かつ残りのいずれの置換基R<sup>°</sup>も水素である請求項14~25のいずれかのオリゴマー。

【請求項27】 少なくとも1つのLNAのビラジカル中の基R<sup>°</sup>がDNAインターラーティー、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択される請求項14~26のいずれかのオリゴマー。

【請求項28】 LNA(類)が一般式Iaを有する請求項14~27のいずれかのオリゴマー。

【請求項29】 一般式Ia

【化3】



[ここで、Xは-O-であり；  
Bは核塩基、DNAインターラーティー、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され；  
Pは、継続するモノマーへのヌクレオシド間結合のラジカル位、または5'-末端基を意味し、そのようなヌクレオシド間結合または5'-末端基は任意に置換基R<sup>°</sup>を含有し；  
R<sup>3''</sup>は先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または3'-末端基を意味する基Pであり；

$R^*$  および  $R^4$  は一緒になって、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^*)-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-O-(C R^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$  および  $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$  から選択されるビラジカルを意味し；ここで各  $R^*$  は水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、かつ/または2つの隣接した(非ジェミナルな)  $R^*$  は一緒になって二重結合を意味してもよく、かつ  $r$  および  $s$  の各々は 0~3 である、ただし  $r+s$  の合計は 1~4 である；置換基  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$  および  $R^5$  の各々は、水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノ-カルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、アジド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド、およびハロゲンから独立して選択され、ここで2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソを意味してもよい] の請求項1のオリゴマーならびにその塩基性塩および酸付加塩。

【請求項30】 1つの  $R^*$  が水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、かつ残りのいずれの置換基  $R^*$  も水素である請求項29のオリゴマー。

【請求項31】 ビラジカルが、 $-O-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-N(R^*)-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{2-4}-$  から選択される

請求項29～30のオリゴマー。

【請求項32】 ピラジカルが $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$ および $-N(R^m)-CH_2-$ から選択される請求項31のオリゴマー。

【請求項33】 Bが核塩基から選択される請求項29～32のいずれかのオリゴマー。

【請求項34】 オリゴマーが、少なくとも1つのLNA[ここで、Bはアデニンおよびグアニンから選択される]および少なくとも1つのLNA[ここで、Bはチミン、シトシンおよびウラシルから選択される]からなる請求項33のオリゴマー。

【請求項35】 R<sup>2</sup>が水素、ヒドロキシおよび任意に置換されたC<sub>1-6</sub>-アルコキシから選択され、かつR<sup>1\*</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup>およびR<sup>5\*</sup>が水素を意味する請求項29～34のいずれかのオリゴマー。

【請求項36】 LNA(類)のいずれかのヌクレオシド間結合が、 $-CH_2-$ 、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NR^m-$ 、 $>C=O$ 、 $>C=NR^m$ 、 $>C=S$ 、 $-Si(R'')_2-$ 、 $-SO-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-P(O)_2-$ 、 $-P(O,S)-$ 、 $-P(S)_2-$ 、 $-PO(R'')-$ 、 $-PO(OCH<sub>3</sub>)-$ および $-PO(NHR^m)-$ [ここで、R<sup>m</sup>は水素およびC<sub>1-4</sub>-アルキルから選択され、かつR''はC<sub>1-6</sub>-アルキルおよびフェニルから選択される]から選択される2～4、好ましくは3の基/原子からなる結合から選択される請求項1～35のいずれかのオリゴマー。

【請求項37】 LNA(類)のいずれかのヌクレオシド間結合が、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CO-CH_2-$ 、 $-CH_2-CHOH-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH=$ 、 $-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-NR^m-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-NR^m-$ 、 $-CH_2-NR^m-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-N$ R<sup>m</sup>-、 $-NR^m-CO-O-$ 、 $-NR^m-CO-NR^m-$ 、 $-NR^m-CS-NR^m-$ 、 $-NR^m-C(=NR^m)-NR^m-$ 、 $-NR^m-CO-CH_2-NR^m-$ 、 $-O-CO-O-$ 、 $-O-CO-CH_2-O-$ 、 $-O-CH_2-CO-O-$ 、 $-CH_2-CO-NR^m-$ 、 $-O-CO-NR^m-$ 、 $-NR^m-CO-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-CO-NR^m-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-NR^m-$ 、 $-CH_2-NR^m-O-$ 、 $-CH_2-NR^m-O-$ 、 $-CH_2-O-N=$ 、 $-CH_2-O-NR^m-$ 、 $-CO-NR^m-CH_2-$ 、 $-CH_2-NR^m-O-$ 、 $-CH_2-NR^m-CO-$ 、 $-O-NR^m-$ CH<sub>2</sub>-、 $-O-CH_2-S-$ 、 $-S-CH_2-O-$ 、 $-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-O-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-S-CH_2-CH=$ 、 $-S-CH_2-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-CH_2-O-$ 、 $-S-CH_2-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-S-CH_2-$ 、 $-CH_2-SO-CH_2-$ 、 $-CH_2-SO<sub>2</sub>-CH_2-$ 、 $-O-SO-O-$ 、 $-O-S(O)_2-O-$ 、 $-O-S(O)_2-CH_2-$ 、 $-O-S(O)_2-NR^m-$ 、 $-NR^m-S(O)_2-CH_2-$ 、 $-O-S(O)_2-CH_2-$ 、 $-O-P(O)_2-O-$ 、 $-O-P(O,S)-O-$ 、 $-O-P(S)_2-O-$ 、 $-$

$S-P(O)_2-O-$ 、 $-S-P(O, S)-O-$ 、 $-S-P(S)_2-O-$ 、 $-O-P(O)_2-S-$ 、 $-O-P(O, S)-S-$ 、 $-O-P(S)_2-S-$ 、 $-S-P(O)_2-S-$ 、 $-S-P(O, S)-S-$ 、 $-S-P(S)_2-S-$ 、 $-O-PO(R'')-O-$ 、 $-O-PO(OCH_3)-O-$ 、 $-O-PO(BH_3)-O-$ 、 $-O-PO(NHR^H)-O-$ 、 $-O-P(O)_2-NR^H-$ 、 $-NR^H-P(O)_2-O-$ 、 $-O-P(O, NR^H)-O-$  および  $-O-Si(R'')_2-O-$  から選択される請求項 36 のオリゴマー。

【請求項 38】 LNA (類) のいずれかのヌクレオシド間結合が、 $-CH_2-CO-NR^H-$ 、 $-CH_2-NR^H-O-$ 、 $-S-CH_2-O-$ 、 $-O-P(O)_2-O-$ 、 $-O-P(O, S)-O-$ 、 $-O-P(S)_2-O-$ 、 $-NR^H-P(O)_2-O-$ 、 $-O-P(O, NR^H)-O-$ 、 $-O-PO(R'')-O-$ 、 $-O-PO(CH_3)-O-$  および  $-O-PO(NHR^H)-O-$  [ここで、 $R^H$  は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択され、かつ  $R''$  が  $C_{1-6}$ -アルキルおよびフェニルから選択される] から選択される請求項 37 のオリゴマー。

【請求項 39】 存在するが  $P$ 、 $P'$  またはビラジカル中に含まれない、LNA の置換基  $R^{1+}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2+}$ 、 $R^3$ 、 $R^{3+}$ 、 $R^{4+}$ 、 $R^5$ 、 $R^{5+}$ 、 $R^6$ 、 $R^{6+}$ 、 $R^7$  および  $R^{7+}$  の各々が、水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アジド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド、およびハロゲン [ここで、2つのジェミナル置換基は一緒になって、オキソを意味してもよく、ここで  $R^{N+}$  は存在するがビラジカルに含まれないとき、水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から独立して選択される請求項 1~38 のいずれかのオリゴマー。

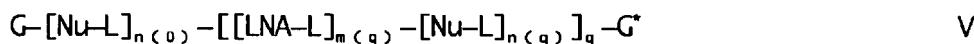
【請求項 40】  $X$  が  $-O-$ 、 $-S-$  および  $-NR^H-$  から選択され、かつ存在するが  $P$ 、 $P'$  またはビラジカル中に含まれない、LNA の置換基  $R^{1+}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2+}$ 、 $R^3$ 、 $R^{3+}$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^{5+}$ 、 $R^6$ 、 $R^{6+}$ 、 $R^7$  および  $R^{7+}$  の各々が水素を意味する請求項 1~39 のいずれかのオリゴマー。

【請求項 41】  $P$  が、水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキルカル

ボニルオキシ、任意に置換されたアリールオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェートおよび  $-W-A'$  [ここで、W は  $-O-$ 、 $-S-$  および  $-N(R^H)-$  から選択され、 $R^H$  は水素および  $C_{1-6}$ -アルキルから選択され、および A' は DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択される] から選択された 5'-末端基である請求項 1 ~ 4 0 のいずれかのオリゴマー。

**【請求項 4 2】**  $P'$  が、水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルオキシ、任意に置換されたアリールオキシおよび  $-W-A'$  [ここで、W は  $-O-$ 、 $-S-$  および  $-N(R^H)-$  から選択され、 $R^H$  は水素および  $C_{1-6}$ -アルキルから選択され、かつ A' は DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択される] から選択された 3'-末端基である請求項 1 ~ 4 1 のいずれかのオリゴマー。

**【請求項 4 3】** 以下の式 V:



[式中、

q は 1~50 であり；

$n(0)$ 、 $\dots$ 、 $n(q)$  の各々は、独立して 0~10000 であり；

$m(1)$ 、 $\dots$ 、 $m(q)$  の各々は、独立して 1~10000 であり；

ただし、 $n(0)$ 、 $\dots$ 、 $n(q)$  および  $m(1)$ 、 $\dots$ 、 $m(q)$  の合計が 2~15000 であり；

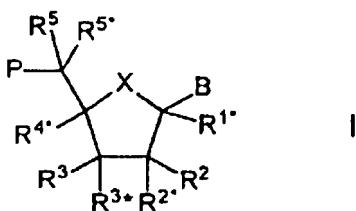
G は 5'-末端基を意味し；

各 Nu は天然に存在するヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体から選択されたヌクレオシドを独立して意味し；

各 LNA はヌクレオシド類似体を独立して意味し；

各 L は、Nu および LNA から選択された 2 つの基の間のヌクレオシド間結合を独立して意味するか、または L は G\* と一緒にになって 3'-末端基を意味し；かつ各 LNA-L は一般式 I：

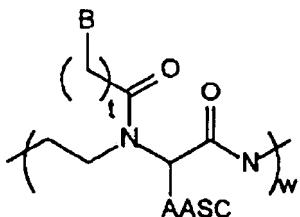
**【化 4】**



[式中、置換基 B、P、P\*、R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>2\*</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4\*</sup>、R<sup>5</sup> および R<sup>5\*</sup>、および X は請求項 1～4 2 で定義したとおりである]  
のヌクレオシド類似体を独立して意味する]  
を有する請求項 1～4 2 のいずれかによるオリゴマー。

【請求項 4 4】 式：

【化 5】



[式中、B は上記で式 I で定義したとおりであり、AASC は水素またはアミノ酸側鎖を意味し、t は 1～5 であり、かつ w は 1～50である] の PNA モノーまたはオリゴマーセグメントからさらになる請求項 1～4 2 のいずれかによるオリゴマー。

【請求項 4 5】 天然のオリゴヌクレオチドと比較して、相補的な ssRNA または ssDNA に対する増加した特異性を有する請求項 1～4 4 のいずれかによるオリゴマー。

【請求項 4 6】 天然のオリゴヌクレオチドと比較して、相補的な ssRNA または ssDNA に対する増加した親和性を有する請求項 1～4 4 のいずれかによるオリゴマー。

【請求項 4 7】 「鎖置換」により、または三重らせん形成により、dsDNA または dsRNA 分子中の標的配列に結合することが可能である請求項 1～4 4 のいずれかによるオリゴマー。

【請求項48】 ヌクレアーゼに対して、天然のオリゴヌクレオチドより抵抗性な請求項1～44のいずれかによるオリゴマー。

【請求項49】 核酸触媒活性(LNA修飾リボザイム)を有する請求項1～44のいずれかによるオリゴマー。

【請求項50】 ヌクレオシド類似体を全く含まない、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドよりも少なくとも2.5℃高い、相補的なDNAオリゴヌクレオチドとのT<sub>m</sub>を、オリゴマーに与える少なくとも1つのヌクレオシド類似体からなるオリゴマー。

【請求項51】 T<sub>m</sub>が、少なくとも2.5×N℃高い[ここで、Nはヌクレオシド類似体の数である]請求項50のオリゴマー。

【請求項52】 ヌクレオシド類似体を全く含まない、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドよりも少なくとも4.0℃高い、相補的なRNAオリゴヌクレオチドとのT<sub>m</sub>を、オリゴマーに与える少なくとも1つのヌクレオシド類似体からなるオリゴマー。

【請求項53】 T<sub>m</sub>が、少なくとも4.0×N℃高い[ここで、Nはヌクレオシド類似体の数である]請求項52のオリゴマー。

【請求項54】 オリゴマーが請求項1～49のいずれかで定義されたものである[ここで、少なくとも1つのヌクレオシド類似体は式I(式中、Bは核塩基である)を有する]請求項50または52のオリゴマー。

【請求項55】 該オリゴマーが、該オリゴマーと1以上のミスマッチを有する部分的に相補的なDNAオリゴヌクレオチドとハイブリッド化するとき、該ミスマッチの結果、T<sub>m</sub>において、ヌクレオシド類似体を全く含まない、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドでみられるであろう減少と等しいかまたはより大きい減少を生じる請求項50のオリゴマー。

【請求項56】 該オリゴマーが、該オリゴマーと1以上のミスマッチを有する部分的に相補的なRNAオリゴヌクレオチドとハイブリッド化するとき、該ミスマッチの結果、T<sub>m</sub>において、ヌクレオシド類似体を全く含まない、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドでみられるであろう減少と等しいかまたはより大きい減少を生じる請求項52のオリゴマー。

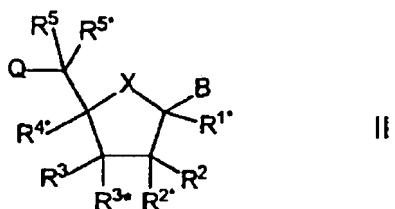
【請求項57】 ハイブリッド化緩衝液のイオン強度に対する  $T_m$  の、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドのと実質的に同じ感受性を有する請求項50または52のオリゴマー。

【請求項58】 少なくとも 30% 修飾されている請求項50または52のオリゴマー。

【請求項59】 相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドよりも実質的に高い3'-エキソヌクレオリティック安定性を有する請求項50または52のオリゴマー。

【請求項60】 一般式 II:

【化6】



[式中、置換基 B は、核塩基、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され；

X は、-O-、-S-、-N(R<sup>n</sup><sup>+</sup>)- および -C(R<sup>6</sup> R<sup>6</sup><sup>+</sup>)- から選択され；

置換基 R<sup>2</sup>、R<sup>2</sup>'、R<sup>3</sup> および R<sup>3</sup>' の一つは基 Q' であり；

Q および Q' の各々は、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、Act-O-、メルカプト、Prot-S-、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、アミノ、Prot-N(R<sup>h</sup>)-、Act-N(R<sup>h</sup>)-、モノ-またはジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、アミノ

メチル、Prot-N(R<sup>h</sup>)-CH<sub>2</sub>-、Act-N(R<sup>h</sup>)-CH<sub>2</sub>-、カルボキシメチル、スルホノメチル（ここで、Protはそれぞれ-OH、-SHおよび-NH(R<sup>h</sup>)のための保護基であり、Actはそれぞれ-OH、-SHおよび-NH(R<sup>h</sup>)のための活性化基であり、R<sup>h</sup>は水素およびC<sub>1-6</sub>-アルキルから選択される）から独立して選択され；

(i) R<sup>2</sup>\* および R<sup>4</sup>\* は一緒になって、-O-、-(CR\* R\*)<sub>r+s+1</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-O-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-、-S-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-N(R\*)-、-S-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-N(R\*)-、-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-S- および -S-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-N(R\*)- から選択されるビラジカルを意味し；

(ii) R<sup>2</sup> および R<sup>3</sup> は一緒になって、-O-、-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- および -(CR\* R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；

(iii) R<sup>2</sup>\* および R<sup>3</sup> は一緒になって、-O-、-(CR\* R\*)<sub>r+s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- および -(CR\* R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；

(iv) R<sup>3</sup> および R<sup>4</sup>\* は一緒になって、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- および -(CR\* R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；

(v) R<sup>3</sup> および R<sup>5</sup> は一緒になって、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- および -(CR\* R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；または

(vi) R<sup>1</sup>\* および R<sup>4</sup>\* は一緒になって、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、および -(CR\* R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；

(vii) R<sup>1</sup>\* および R<sup>2</sup>\* は一緒になって、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-O-(CR\* R\*)<sub>s</sub>-、-(CR\* R\*)<sub>r</sub>-S-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- および -(CR\* R\*)<sub>r</sub>-N(R\*)-(CR\* R\*)<sub>s</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；

ここで、各 R\* は、水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ-またはジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、任意に置換された C

$C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド、から独立して選択され、かつ/または2つの隣接する(非ジェミナルな)R<sup>\*</sup>は、一緒になって二重結合を意味してもよく、かつ r および s の各々は0～3であり、ただし r+s の合計は1～4である;

Q、Q<sup>\*</sup> またはビラジカル中に含有されない置換基 R<sup>1\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>2\*</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4\*</sup>、R<sup>5</sup> および R<sup>5\*</sup> の各々は、水素、任意に置換された  $C_{1-12}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルキニル、ヒドロキシ、C<sub>1-12</sub>-アルコキシ、C<sub>2-12</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-12</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-12</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C<sub>1-6</sub>-アルカノイルオキシ、スルホノ、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは任意に置換されてもよく、ここで2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソ、チオキソ、イミノまたは任意に置換されたメチレンを意味してもよく、または -O-、-S- および -(NR<sup>n</sup>)- から選択される1以上のヘテロ原子/基により任意に割り込まれかつ/または末尾をなしでいる1～5の炭素原子アルキレン鎖からなるスピロラジカルを一緒になって形成してもよく、ここで R<sup>n</sup> は水素および C<sub>1-4</sub>-アルキルから選択され、ここで2つの隣接する(非ジェミナルな)置換基は二重結合を生じる付加的な結合を意味してもよく;かつ R<sup>n\*</sup> は存在するがビラジカル中に含有されないときは、水素および C<sub>1-4</sub>-アルキルから選択され;

ただし第1の条件として、

(i)  $R^2$  および  $R^3$  は一緒にになって  $-O-CH_2-CH_2-$  および  $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$  から選択されるピラジカルを意味せず;かつ  
 (ii)  $R^3$  および  $R^5$  は一緒にになって  $-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-$  および  $-O-Si(^1Pr)_2-O-$   
 $-Si(^1Pr)_2-O-$  から選択されるピラジカルを意味せず;  
 ただし第2の条件として、オリゴヌクレオチド合成で普及している条件下で反応性ないかなる化学基(核塩基を含む)も、任意に保護された官能基である]のヌクレオシド類似体(以後、LNA)ならびにその塩基性塩および酸付加塩。

【請求項61】 基Bが核塩基および官能基保護された核塩基から選択される請求項60のヌクレオシド類似体。

【請求項62】 Xが、 $-O-$ 、 $-S-$  および  $-N(R^N)^+$  から選択される請求項60～61のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項63】 存在するが  $Q$ 、 $Q^*$  またはピラジカル中に含まれない、置換基  $R^{1+}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2+}$ 、 $R^3$ 、 $R^{3+}$ 、 $R^{4+}$ 、 $R^5$  および  $R^{5+}$  の各々が、水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アジド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンドおよびハロゲン [ここで、2つのジェミナル置換基は一緒にになって、オキソを意味してもよく、ここで  $R^N$  は、存在するがピラジカル中に含まれないとき、水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される、ただしヒドロキシ、アミノ、モノ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、スルファニルおよびカルボキシのいずれも任意に保護される] から独立して選択される請求項60～62のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項64】 存在するが  $Q^*$  またはピラジカル中には含まれない、置換基  $R^{1+}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2+}$ 、 $R^3$ 、 $R^{3+}$ 、 $R^{4+}$  および  $R^5$ 、 $R^{5+}$ 、 $R^6$ 、 $R^{6+}$  の各々が、水素を意味する請求項60～63のいずれかのヌクレオチド類似体。

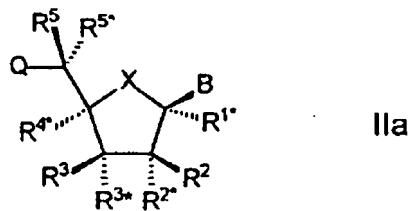
【請求項65】  $R^3^*$  が  $P^*$  を意味する請求項60～64のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項66】  $Q$  が、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、メルカプト、Prot-S-、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、Prot-N( $R^H$ )-、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、アミノメチル、Prot-N( $R^H$ )-CH<sub>2</sub>-、カルボキシメチル、スルホノメチル [ここで、Prot は -OH、-SH および -NH( $R^H$ ) それぞれの保護基であり、 $R^H$  は水素および  $C_{1-6}$ -アルキルから選択される] から独立して選択されかつ

$Q^*$  は水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Act-O-、メルカプト、Act-S-、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、Act-N( $R^H$ )-、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ [ここで、Act は -OH、-SH および -NH( $R^H$ ) それぞれの活性基であり、 $R^H$  は水素および  $C_{1-6}$ -アルキルから選択される] から選択される請求項60～65のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項67】 一般式 IIa：

【化7】



[式中、置換基  $Q$ 、 $B$ 、 $R^{1*}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2*}$ 、 $R^3$ 、 $R^{3*}$ 、 $R^{4*}$ 、 $R^5$  および  $R^{5*}$  は請求項 60～66において定義したとおりである]  
を有する請求項 60～66のいずれかのヌクレオチド類似体。

【請求項 68】  $R^3*$  が  $P^*$  を意味する請求項 67 のヌクレオシド類似体。

【請求項 69】  $R^2*$  および  $R^4*$  は一緒になって、ビラジカルを意味する請求項 68 のヌクレオシド類似体。

【請求項 70】  $X$  が  $O$  であり、 $R^2$  が水素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、かつ  $R^{1*}$ 、 $R^3$ 、 $R^5$  および  $R^{5*}$  は水素を意味する請求項 69 のヌクレオシド類似体。

【請求項 71】 ビラジカルが  $-O-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-$   
 $-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{0-1}-N(R^4)-(CH_2)_{1-3}-$  から選択される請求項 70 のヌクレオシド類似体。

【請求項 72】 ビラジカルが  $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$  および  $-N(R^4)-CH_2-$  から選択される請求項 71 のヌクレオシド類似体。

【請求項 73】  $B$  が核塩基から選択される請求項 69～72 のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項 74】 オリゴマーが、少なくとも 1 つの LNA [ここで、 $B$  はアデニンおよびグアニンから選択される] および少なくとも 1 つの LNA [ここで、 $B$  はチミン、シトシンおよびウラシルから選択される] からなる請求項 73 のヌクレオシド類似体。

【請求項 75】 ビラジカルが  $-(CH_2)_{2-4}-$  であり、好ましくは  $-(CH_2)_2-$  である請求項 70 のヌクレオシド類似体。

【請求項 76】  $R^2$  および  $R^3$  が一緒になって、ビラジカルを意味する請求項 68 のヌクレオシド類似体。

【請求項77】  $X$  が  $-O-$  であり、 $R^2$  が水素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、かつ  $R^{1*}$ 、 $R^{4*}$ 、 $R^5$  および  $R^{5*}$  が水素を意味する請求項76のヌクレオシド類似体。

【請求項78】 ピラジカルが  $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$  である請求項77のヌクレオシド類似体。

【請求項79】 ピラジカルが  $-(CH_2)_{1-4}-$  である請求項77のヌクレオシド類似体。

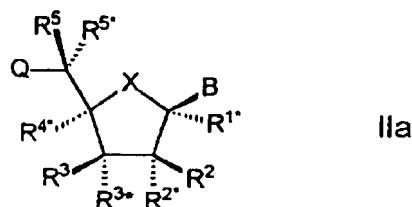
【請求項80】 1つの  $R^*$  が水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、残りの置換基  $R^*$  のいずれも水素である請求項68～79のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項81】 少なくとも1つの LNA のピラジカル中の基  $R^*$  が、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択される請求項68～80のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項82】 LNA(類) が一般式Iaを有する請求項68～81のいずれかのヌクレオシド類似体。

【請求項83】 一般式IIa：

【化8】



[式中、 $X$  が  $-O-$  であり；  
 $B$  が核塩基、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され；  
 $R^*$  が基  $Q^*$  であり；

$Q$  および  $Q'$  の各々が、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、Act-O-、メルカプト、Prot-S-、Act-S-、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、Prot-N( $R^H$ )-、Act-N( $R^H$ )-、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、アミノメチル、Prot-N( $R^H$ )-CH<sub>2</sub>-、Act-N( $R^H$ )-CH<sub>2</sub>-、カルボキシメチル、スルホノメチル [ここで、Prot は -OH、-SH および -NH( $R^H$ ) それぞれの保護基であり、Act は -OH、-SH および -NH( $R^H$ ) それぞれの活性基であり、かつ  $R^H$  は水素および  $C_{1-6}$ -アルキルから選択される] から独立して選択され；

$R^2$ ° および  $R^4$ ° は一緒になって、-O-、-S-、-N( $R^*$ )-、-(CR° R°)<sub>r+s+1</sub>-、-(CR° R°)<sub>r</sub>-O-(CR° R°)<sub>s</sub>-、-(CR° R°)<sub>r</sub>-S-(CR° R°)<sub>s</sub>-、-(CR° R°)<sub>r</sub>-N( $R^*$ )-(CR° R°)<sub>s</sub>-、-O-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-O-、-S-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-S-、-N( $R^*$ )-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-N( $R^*$ )-、-S-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-S-、-N( $R^*$ )-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-N( $R^*$ )-、-N( $R^*$ )-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-S- および -S-(CR° R°)<sub>r+s</sub>-N( $R^*$ )- から選択されるビラジカルを意味し；ここで、各  $R^*$  は水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、かつ/または2つの隣接した(非ジェミナルな)  $R^*$  は一緒になって、二重結合を意味してもよく、かつ  $r$  および  $s$  の各々は 0 ~3 である、ただし  $r+s$  の合計は 1~4 である；

置換基  $R^1$ °、 $R^2$ °、 $R^3$ °、 $R^5$ ° および  $R^6$ ° の各々は、水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、

カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アジド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド、およびハロゲン [ここで、2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソを意味してもよい] から独立して選択され；

ただし、オリゴヌクレオチド合成において普及している条件下で反応性ないずれの化学基(いずれの核塩基も含む)も、任意に官能基保護される] の請求項 60 のヌクレオシド類似体ならびにその塩基性塩および酸付加塩。

**【請求項 8 4】** 1つの  $R^*$  が水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、残りの置換基  $R^*$  のいずれも水素である請求項 8 3 のヌクレオシド類似体。

**【請求項 8 5】** ピラジカルが  $-O-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-$   $-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-N(R^*)-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{2-4}-$  から選択される請求項 8 3 ~ 8 4 のいずれかのヌクレオチド類似体。

**【請求項 8 6】** ピラジカルが  $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$  および  $-N(R^*)-CH_2-$  から選択される請求項 8 5 のヌクレオシド類似体。

**【請求項 8 7】** B が核塩基から選択される請求項 8 3 ~ 8 6 のいずれかのヌクレオシド類似体。

**【請求項 8 8】** オリゴマーが、少なくとも1つの LNA [ここで、B がアデニンおよびグアニンから選択される] および少なくとも1つの LNA [ここで B がチミン、シトシンおよびウラシルから選択される] からなる請求項 8 7 のヌクレオシド類似体。

**【請求項 8 9】** B が核塩基を意味し、X が  $-O-$  であり、 $R^{2*}$  および  $R^{4*}$  が一緒になって、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{0-1}-N(R^*)-(CH_2)_{1-3}-$  [ここで、 $R^*$  は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から選択されるピラジカルを意味し、Q は Prot-O- を意味し、 $R^{3*}$  は

Act-OH を意味する  $Q^*$  であり、かつ  $R^{1*}$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$  および  $R^{5*}$  の各々は水素を意味する [ここで、Act および Prot は請求項 5 8 で定義したとおりである] 請求項 8 3 のヌクレオシド類似体。

**【請求項 9 0】**  $B$  が核塩基を意味し、 $X$  が  $-O-$  であり、 $R^2*$  および  $R^4*$  が一緒になって、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{0-1}-N(R^W)-(CH_2)_{1-3}-$  [ここで、 $R^W$  は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から選択されるピラジカルを意味し、 $Q$  がヒドロキシ、メルカプト、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェートおよびトリホスフェートから選択され、 $R^3*$  は水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルおよび任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシから選択された  $Q^*$  であり、 $R^3$  が水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルおよび任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルから選択され、かつ  $R^{1*}$ 、 $R^2$ 、 $R^5$  および  $R^{5*}$  は各々水素を意味する請求項 8 3 のヌクレオシド類似体。

**【請求項 9 1】**  $B$  が核塩基を意味し、 $X$  が  $-O-$  であり、 $R^2$  および  $R^3$  が一緒になって、 $-(CH_2)_{0-1}-O-CH=CH-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-CH=CH-$  および  $-(CH_2)_{0-1}-N(R^W)-CH=CH-$  [ここで、 $R^W$  は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から選択されるピラジカルを意味し、 $Q$  がヒドロキシ、メルカプト、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェートおよびトリホスフェートから選択され、 $R^3*$  が水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、

任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルおよび任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシから選択される  $Q^*$  であり、かつ  $R^{1*}$ 、 $R^{2*}$ 、 $R^{4*}$ 、 $R^5$  および  $R^{5*}$  が各々水素を意味する請求項 8 3 のヌクレオシド類似体。

**【請求項 9 2】**  $(1R,3R,4R,7S)-7-(2\text{-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ})-1-(4,4'\text{-ジメトキシトリチルオキシメチル})-3-(チミン-1\text{-イル})-2,5\text{-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン}$ 、 $(1R,3R,4R,7S)-7\text{-ヒドロキシ-1-(4,4'\text{-ジメトキシトリチルオキシメチル})-3-(チミン-1\text{-イル})-2,5\text{-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-7-O-(2\text{-クロロフェニルホスフェート})}$  および  $(1R,3R,4R,7S)-7\text{-ヒドロキシ-1-(4,4'\text{-ジメトキシトリチルオキシメチル})-3-(チミン-1\text{-イル})-2,5\text{-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-7-O-(H\text{-ホスホネート})}$  ならびにそれらの 3-(シトシン-1-イル)、3-(ウラシル-1-イル)、3-(アデニン-1-イル)および 3-(グアニン-1-イル)類似体から選択される請求項 6 0 のヌクレオシド類似体。

**【請求項 9 3】** 請求項 1 ~ 5 9 のいずれかの LNA 修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)の製造用の請求項 6 0 ~ 9 2 のいずれかに定義された LNA の使用。

**【請求項 9 4】** LNA 修飾オリゴヌクレオチドが、リボヌクレオシドおよび/またはジオキシリボヌクレオシドならびに請求項 6 0 に定義したものとは異なる修飾ヌクレオシドのような正常なヌクレオシドからなる請求項 9 3 の使用。

**【請求項 9 5】** LNA の組み込みが核酸活性酵素用基質としてふるまうためのオリゴヌクレオチドの能力を調節する請求項 9 3 の使用。

**【請求項 9 6】** タンパク質、アンプリコン、酵素、ポリサッカライド、抗体、ハプテン、ヘプチドおよび PNA から選択される化合物ならびに LNA 修飾オリゴヌクレオチドの抱合体の製造用の請求項 6 0 ~ 9 2 のいずれかで定義された LNA の使用。

**【請求項 9 7】** 請求項 1 ~ 5 9 のいずれかで定義されたような LNA 修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)ならびにタンパク質、アンプリコン、酵素、ポリサッカライド、抗体、ハプテン、ヘプチドおよび PNA から選択された化合物の抱合体。

【請求項98】 核酸に活性な酵素の基質としての請求項60～92のいずれかで定義されたようなLNAの使用。

【請求項99】 請求項60中の式I中の置換基Qがトリホスフェートを意味する請求項98の使用。

【請求項100】 LNAがDNAおよびRNAポリメラーゼの基質として使用される請求項98の使用。

【請求項101】 治療薬としての、請求項60～92のいずれかで定義されたLNAの使用。

【請求項102】 診断目的用の請求項60～92のいずれかで定義されたLNAの使用。

【請求項103】 任意に保護された核塩基および任意に5'-OH保護されたLNAをその上に固定した固体支持体材料。

【請求項104】 その上に、異なる配列のLNA修飾オリゴヌクレオチドが付着している固体表面の構造中における、請求項60～92のいずれかで定義された1以上のLNAの使用。

【請求項105】 LNA修飾オリゴヌクレオチドがあらかじめ決められたパターンで付着している請求項113の使用。

【請求項106】 LNAが、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドのTmを等しくするのに使用される請求項113の使用。

【請求項107】 LNA修飾オリゴヌクレオチドが、天然のオリゴヌクレオチドと比べて相補的なssDNAまたはssRNAに対する増加した親和性を有する請求項113の使用。

【請求項108】 LNA修飾オリゴヌクレオチドが、天然のオリゴヌクレオチドと比べて相補的なssDNAまたはssRNAに対する増加した特異性を有する請求項113の使用。

【請求項109】 標的核酸の配列特異的開裂における、請求項1～59のいずれかで定義されたようなLNA修飾オリゴマー(リボザイム)の使用。

【請求項110】 例えばアンチセンス、抗原または遺伝子活性化治療としての、治療における、請求項1～59のいずれかで定義されたようなLNA修飾

オリゴヌクレオチド(オリゴマー)の使用。

【請求項111】 LNA修飾オリゴヌクレオチドが RNaseH をリクルートする請求項110の使用。

【請求項112】 請求項1～59のいずれかで定義したような LNA修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)の1以上の複合体の例えは、アンチセンス、抗原または遺伝子活性化治療としての治療における使用。

【請求項113】 アプタマーとしての治療適用における、請求項1～59のいずれかで定義したような LNA修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)の使用。

【請求項114】 LNA修飾オリゴヌクレオチドが、ホスフェートジエステル結合ではない少なくとも1つのヌクレオシド間結合からなる請求項119の使用。

【請求項115】 診断における、例えば天然または合成核酸の単離、精製、増幅、検出、同定、定量または捕捉のための、請求項1～59のいずれかで定義したような LNA修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)の使用。

【請求項116】 オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチドの直接または間接検出またはオリゴムクレオチドの固形支持体上への固定を容易にする、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基またはリガンドからなる請求項115による使用。

【請求項117】 光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基またはリガンドがスペーサー(K)を含有し、該スペーサーが化学的に開裂可能な基からなる請求項116による使用。

【請求項118】 光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基またはリガンドが、オリゴヌクレオチドの少なくとも1つの LNA(類)のビラジカル(すなわち R<sup>•</sup> として)によって結合している請求項116による使用。

【請求項119】 RNAまたはDNAのような、天然に存在するまたは合成二重鎖もしくは一重鎖核酸の捕捉および検出用の請求項115による使用。

【請求項120】 RNAまたはDNAのような、天然に存在する二重鎖また

は一重鎖核酸の精製用の請求項115による使用。

【請求項121】 その場でのハイブリッド化、サザンハイブリッド化、ドットプロットハイブリッド化、逆ドットプロットハイブリッド化またはノーザンハイブリッド化における、プローブとしての請求項115による使用。

【請求項122】 親和性対の構造における請求項115による使用。

【請求項123】 核酸配列反応またはプライマー伸長反応におけるプライマーとしての請求項115による使用。

【請求項124】 核酸増幅反応におけるプライマーとしての請求項115による使用。

【請求項125】 プライマーが、増幅反応が本質的に直鎖状反応であるように適応された請求項124による使用。

【請求項126】 プライマーが、増幅反応が本質的に指数的反応であるように適応された請求項124による使用。

【請求項127】 核酸増幅反応が少なくとも1つの一重鎖末端からなる二重鎖DNA生成物を生じる請求項124～126のいずれかによる使用。

【請求項128】 分子診断におけるアプタマーとしての、請求項1～59のいずれかに定義されたようなLNA修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項129】 RNA媒介触媒的方法におけるアプタマーとしての、請求項1～59のいずれかに定義されたようなLNA修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項130】 抗生物質、薬物、アミノ酸、ヘプチド、構造タンパク質、タンパク質レセプター、タンパク質酵素、サッカライド、ポリサッカライド、生物的補助因子、核酸またはトリホスフェートの特異的結合におけるアプタマーとしての、請求項1～59のいずれかに定義されたようなLNA修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項131】 立体特異的結合によるラセミ混合物からの鏡像異性体の分離におけるアプタマーとしての、請求項1～59のいずれかに定義したようなLNA修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項132】 細胞を標識化するための、請求項1～59のいずれかに定義したような LNA 修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項133】 標識化が、非標識細胞から分離させる請求項132による使用。

【請求項134】 生体内または試験管内での、tRNA、rRNA、snRNA および scRNA のような非-タンパク質コーディング細胞性 RNA をハイブリッド化するための請求項1～59のいずれかで定義したような LNA 修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項135】 オリゴヌクレオチドのハイブリッド化状態が、プローブからの蛍光シグナルの増加により、非結合状態のオリゴヌクレオチドから区別できるように配置させた発蛍光剤と消光剤とを含むオリゴヌクレオチドの構築への請求項1～59のいずれかに定義されたような LNA 修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項136】 タックマンプローブまたは分子標識の構築への請求項1～59のいずれかに定義されたような LNA 修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)による使用。

【請求項137】 反応本体および請求項1～59のいずれかに定義されたような1以上の LNA 修飾オリゴヌクレオチド(オリゴマー)からなる、天然または合成核酸の単離、精製、增幅、検出、同定、定量または捕捉用キット。

【請求項138】 LNA 修飾オリゴヌクレオチドが該反応本体上に固定される請求項137のキット。

【請求項139】 反応本体および請求項60～92のいずれかで定義されたような1以上の LNA からなる、天然または合成核酸の、単離、精製、增幅、検出、同定、定量または捕捉用キット。

【請求項140】 LNA が該反応本体の上に固定される請求項139のキット。

【0001】

### 【発明の詳細な説明】

#### (発明の分野)

この発明は、2環式および3環式ヌクレオシド類似体の分野および、1本鎖および2本鎖核酸と、核塩基 (nucleobase) 特異性な2重らせんおよび3重らせんを形成しうる合成オリゴヌクレオチド類の製造において有用な、そのようなヌクレオシド類似体の合成に関する。これら複合体は普通の核酸とから形成された対応する複合体よりも高い熱安定性を示す。この発明はまた、2環式および3環式ヌクレオシド類似体の分野、および治療薬として用いることができかつ、錫型依存性核酸ポリメラーゼによりオリゴヌクレオチドに組み込むことができる、そのようなヌクレオシド類の製造にも関する。

#### 【0001】

#### (発明の背景)

合成オリゴヌクレオチド類は、分子生物学およびDNAベースの診断と治療のような異種の分野で広く用いられている化合物である。

#### 【0002】

#### (治療)

治療においては例えば、オリゴヌクレオチド類は、特定のmRNA(メッセンジャーRNA)の生体内での翻訳をブロックしそれによって細胞/有機体にとって望ましくないかあるいは有害であるタンパク質の合成を妨げるのに、有効に用いられてきた。このオリゴヌクレオチド媒介の翻訳ブロックの概念は、“アンチセンス”アプローチとして知られている。機構的には、このハイブリッド化するオリゴヌクレオチドは、翻訳プロセスに対して物理的なブロックを作るかあるいは2重らせんのmRNA部分を特異的に退化させる細胞酵素(RNaseH)をリクルート (recruit)することによって、その効果を惹起すると考えられる。

#### 【0003】

さらに最近では、RNase触媒活性と、相補的RNAターゲット(リボザイム)と配列特異的に相互作用する能力とを合わせ有するオリゴリボヌクレオチド類およびオリゴデオキシリボヌクレオチド類およびそれらの類似体が、アンチセンスのプローブとして多くの注目を集めている。これまで、リボザイムは、生体ターゲット

および腫瘍遺伝子の両方に対して細胞培養において有効であると報告されている。

### 【0004】

所定のタンパク質の合成をアンチセンスアプローチによって完全に阻止するためには、その特定のタンパク質をエンコードする全てのmRNAをブロック／破壊する必要があるが、多くの場合、これらのmRNAはかなりの数に上る。通常、特定のタンパク質をエンコードするmRNAは、1あるいは2、3個の遺伝子から転写される。したがって、mRNA生成物よりむしろ遺伝子をターゲットにする("アンチ遺伝子"アプローチ)ことによって、それを同起源とするタンパク質の生成をより効率的に阻害しうるかあるいは所望の効果を惹起するのに必要とされるオリゴヌクレオチドの量を大幅に低減しうるはずである。転写を阻害するために、オリゴヌクレオチドは、特異的に2本鎖DNAへ、配列をハイブリッド化し得なくてはならない。1953年、WatsonとCrickは、デオキシリボ核酸(DNA)が、2つの鎖中の対向する相補的核塩基間に形成された水素結合によってらせん状に組み合わされた2つの鎖で構成されていることを示した(Nature, 1953, 171, 737)。その4つの核塩基は、DNAに共通して見い出されるものであり、グアニン(G)、アデニン(A)、チミン(T)およびシトシン(C)である。このうち、核塩基Gは核塩基Cと対になり、核塩基Aは核塩基Tと対になる。RNAでは、核塩基チミンは核塩基ウラシル(U)と置きかえられ、核塩基Uは核塩基Tと同様に、核塩基Aと対になる。標準的な2重らせん形成に関係する核塩基の化学基は、ワトソン・クリックフェイス(Watson-Crick face)を形成する。1959年、フーグスティーン(Hoogsteen)は、プリン核塩基(GおよびA)が、ワトソン・クリックフェイスに加え、2重らせんの外側から認識され、水素結合を介してピリミジンオリゴヌクレオチドに結合するのに用いられるフーグスティーンフェイス(Hoogsteen face)を有し、それによって三重らせん構造を形成することを示した。三重らせんを形成するオリゴマーは、"アンチ遺伝子"アプローチを概念上可能にするとはいえ、その実用性は、現在のところ、ターゲット遺伝子におけるホモプリン配列モティーフの要件および複合体を安定化させるための生理的に正常でないほどの高いイオン強度と低いpHの必要性を含む、いくつかの要因によって制限されている。

### 【0005】

アプタマーとして知られるオリゴヌクレオチドの用途も、精力的に研究されている。この有望な新しいクラスの治療用オリゴヌクレオチドは、例えばリガンド受容体のような高い親和性を有する所定のターゲットに特異的に結合するように試験管内で選択される。その結合特性は、分子内の核塩基対合により一緒にになっている三次元構造を形成するオリゴヌクレオチドの能力を反映しているとみられる。

### 【0006】

同様に、ヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体は、多数のウイルス感染症や癌の化学療法において有効であることがわかっている。

### 【0007】

また、種々のタイプの2本鎖RNAは、いくつかのタイプの癌の成長を有効に抑制することも示されている。

### 【0008】

#### (診断)

分子生物学において、オリゴヌクレオチドは、例えば(i)ターゲット核酸の捕捉、同定および定量におけるハイブリダイゼーションプローブとして、(ii)ターゲット核酸の精製の親和性プローブとして、(iii)配列決定反応およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)のようなターゲット増幅プロセスにおけるプライマーとして、(iv)核酸をクローンし、突然変異化させるものとして、(vi)巨大分子構造集合体での基礎単位として種々の目的に日常的に用いられる。

### 【0009】

診断では、上記のオリゴヌクレオチドベースの技術の多く、特に簡便な自動化に適し高感度の再現可能な成果を生みだし易くする技術が利用される。この分野の目標は、例えば(i)人間、動物および食物における病原性微生物の存在を検査し、(ii)遺伝子学的な疾患素質を検査し、(iii)生得的なあるいは後天的な遺伝学的疾患を特定し、(iv)生物学的沈着物を刑事裁判の容疑者に結びつけ、(v)食物および飲料の生産に関する微生物の存在を評価する手段として、オリゴヌクレオチドベースの技術を用いることである。

## 【0010】

(一般的な考察)

上に概説した様々の広範な適用において有用であるためには、オリゴヌクレオチドは種々の多くの要件を満たさなくてはならない。アンチセンス治療法では例えば、有用なオリゴヌクレオチドであるためには、細胞膜を貫通することができ、細胞外および細胞内ヌクレアーゼに対する耐性が良好であり、好ましくはRNases Hのような内在性酵素をリクルートする能力を備えていなくてはならない。DNAベースの診断および分子生物学では、他の性質、例えば、天然の核酸に作用するように進化した種々の広範な酵素、例えばポリメラーゼ、キナーゼ、リガーゼおよびホスファターゼに対する効率のよい基質として作用するオリゴヌクレオチドの能力が重要である。しかしながら、全ての用途の基礎になるオリゴヌクレオチドの根本的な性質は、ワトソン・クリック水素結合(A-T およびG-C)あるいはフーグスティーンモードのような他の水素結合系を用いて、配列を認識し、特異的にハイブリッド化して相補的1本鎖核酸にする能力である。重要な2つの用語である親和性と特異性は、所定のオリゴヌクレオチドのハイブリッド化特性を特徴づけるのに共通して用いられる。親和性は、オリゴヌクレオチドの、その相補的ターゲット配列に対する結合強度の尺度である（2重らせんの熱安定性( $T_m$ )として表わされる）。2重らせんの各核塩基対によって熱安定性が増し、したがってオリゴヌクレオチドのサイズ（核塩基のNo.）が大きいほど親和性が高くなる。特異性は、完全に相補的ターゲット配列とミスマッチのターゲット配列とを区別するオリゴヌクレオチドの能力の尺度である。換言すると、特異性は、ターゲットにおけるミスマッチの核塩基対に関連した親和性損失の尺度である。オリゴヌクレオチドが一定のサイズの場合、オリゴヌクレオチドとそのターゲットとの間でのミスマッチの数が増すにつれて（すなわち、ミスマッチのパーセンテージが大きくなる）、特異性が大きくなる。反対に、ミスマッチが一定の数の場合、オリゴヌクレオチドのサイズが大きくなるにつれて（すなわち、ミスマッチのパーセンテージが小さくなる）、特異性は小さくなる。別の言い方をすると、オリゴヌクレオチドの親和性の増大は特異性を犠牲にして生じ、逆もまた同じである。

## 【0011】

このオリゴヌクレオチドの性質によって、その実用化には多くの問題が生じる。冗長な診断手法では例えば、検査での適切な感度を確保するための高い親和性と、誤った決定的な結果を避けるための高い特異性との両方をオリゴヌクレオチドが有することが必要である。同様に、アンチセンスプローブとして用いられるオリゴヌクレオチドでは、そのターゲットmRNAの翻訳を効率よく阻害するための高い親和性と、他のタンパク質の発現を誤ってブロックするのを避けるための高い特異性との両方を有することが必要である。PCR増幅のような酵素反応では、酵素が活性を発揮する温度範囲でプライマー／ターゲット2重らせんが安定化するに足るだけのオリゴヌクレオチドプライマーの親和性の高さ、および正しいターゲット配列だけが増幅されるに足るだけの特異性の高さが必要がある。

## 【0012】

天然のオリゴヌクレオチドのこの欠点を当然のこととすれば、特異性と親和性を高める新しいアプローチは、DNAベースの治療と診断および分子生物学分野での技術全般に非常に有用であるだろう。

## 【0013】

(立体配座制限されたヌクレオシド)

オリゴヌクレオチド類は、ターゲット配列へハイブリッド化する過程で、1本鎖の状態の比較的ランダムなコイル構造から、2重らせんの状態の整列された構造へと立体配置が移行することが知られている。

## 【0014】

2環式および3環式ヌクレオシド類似体を含む、多数の立体配座制限されたオリゴヌクレオチド(図1Aおよび図1B、そこではB=核塩基)が合成され、オリゴヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチド類似体に組みこまれ、そのハイブリッド化とその他の性質について分析されている。

## 【0015】

付加的なC-3', C-5'-エタノ-橋かけを有する2環式[3.3.0]オリゴヌクレオシド(bcDNA)(AおよびB)は、5つの核塩基(G、A、T、CおよびU)全てと合成され、(C)は、T核塩基およびA核塩基とだけ合成されている(M. Tarkoy, M. Bolla, B

. Schweizer および C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 1993, 76, 481; Tarkoy および C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1993, 32, 1432; M. Egli, P. Lubini, M. Dobler および C. Leumann, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 5855; M. Tarkoy, M. Bolli および C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 1994, 77, 716; M. Bolli および C. Leumann, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1995, 34, 694; M. Bolli, P. Lubini および C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 2077; J. C. Litten, C. Epple および C. Leumann, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1995, 5, 1231; J. C. Litten および C. Leumann, *Helv. Chim. Acta*, 1996, 79, 1129; M. Bolli, J. C. Litten, R. Schultz および C. Leumann, *Chem. Biol.*, 1996, 3, 197; M. Bolli, H. U. Trafelet および C. Leumann, *Nucleic Acids Res.*, 1996, 24, 4660)。これらの類似体の2、3個を含むかあるいはこれらの類似体から全てを構成されているDNAオリゴヌクレオチド類は、ほとんどの場合、相補的DNAオリゴヌクレオチドおよびRNAオリゴヌクレオチドと、ワトソン・クリック型結合の2重らせんを形成することができる。しかしながら、得られた2重らせんの熱安定性は、天然のDNA対およびRNA対の熱安定性よりも顕しく低い(C)、少し低い(A)、同程度である(B)かのいずれかである。全てのbcDNAオリゴマーは、天然の対に比べ、ハイブリッド化媒体のイオン強度に対して著しく高い感度を示した。 $\alpha$ -2環式-DNA (B)は、3'-エクソヌクレアーゼヘビ毒ホスホジエテラーゼに対して $\beta$ -2環式-DNA (A)よりも安定であり、 $\beta$ -2環式-DNA (A)は、修飾されていないオリゴヌクレオチドよりも少しだけより安定である。

### 【0016】

シクロペンタン環に付加的C-1', C-6' -あるいはC-6', C-4' -メタノ-橋かけを有するビカルボンシクロ[3.1.0]ヌクレオシド(それぞれDおよびE)は、5つの核塩基(T、A、G、CおよびU)全てと合成されている。しかしながら、T-類似体だけがオリゴマーに組み込まれている。混合ポリピリミジンDNAオリゴヌクレオチドに1あるいは10個のモノマーDを組み込まれた結果、修飾されていない参照オリゴヌクレオチドに比べ、DNAオリゴヌクレオチドとRNAオリゴヌクレオチドとの両方に対する親和性が実質的に減少した。この減少はssRNA(1本鎖R

NA) の場合よりも ssDNA(1本鎖DNA)の場合のほうが著しかった。2個の異なるポリーピリミジンDNAオリゴヌクレオチドに1個のモノマーEが組み込まれると、修飾されていない参照2重らせんに比べ、ssRNAに対する2重らせんのT<sub>m</sub>が0.8℃および2.1℃だけ上昇した。10個のT-類似体がもっぱらホスホロチオエート(phosphorothioate)ヌクレオシド間(internucleoside)結合を有する15量体オリゴヌクレオチドに組み込まれると、相補的RNAオリゴヌクレオチドに対するT<sub>m</sub>が、同様の修飾されていないホスホロチオエート配列に比べ、1つの修飾につき約1.3℃上昇した。参照配列とは反対に、2環式ヌクレオシドEを含むオリゴヌクレオチドは、RNaseHの開裂の媒介とならなかった。EのG、A、CおよびU-類似体を含むオリゴヌクレオチドのハイブリッド化特性は報告されていない。また、この類似体の化学的性質は、完全修飾オリゴヌクレオチドに関するいっそうの鋭意な研究には適していない(K.-H. Altmann, R. Kesselring, E. FrancotteおよびG. Rihs, Tetrahedron Lett., 1994, 35, 2331; K.-H. Altmann, R. Imwinkeled, R. Kesselring および G. Rihs, Tetrahedron Lett., 1994, 35, 7625; V. E. Marquez, M. A. Siddiqui, A. Ezzitouni, P. Russ, J. Wang, R. W. Wagner および M. D. Matteucci, J. Med. Chem., 1996, 39, 3739; A. Ezzitouni および V. E. Marquez, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1997, 1073)。

### 【0017】

付加的なC-2',C-3'-ジオクサレイン(dioxalane)環を含む2環式[3.3.0]ヌクレオシドは、修飾されていないヌクレオシドとの2量体として合成されているが、ここで、付加的な環は、天然のホスホジエステル結合(F)に代わるヌクレオシド間結合の一部である。この類似体は、チミン-チミンプロックあるいはチミン-5-メチルシトシンプロックのいずれかとして合成されるだけであった。これらの2量体プロックを7個含むとともにホスホジエステル結合およびリボアセタール結合を交互に有する15量体ポリピリミジン配列では、もっぱら天然のホスホジエステルヌクレオシド間結合を有する参照配列に比べ、相補的ssRNAに対するT<sub>m</sub>が実質的に低くなつた(R. J. Jones, S. Swaminathan, J. F. Milligan, S. Wadwani, B. S. Froehler および M. Matteucci, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 9816)。

## 【0018】

アセタール型のヌクレオシド間結合において付加的な2環式[4.3.0]システムを形成する、付加的なC-2', C-3' -ジオキサン環を有する2個の2量体(GおよびH)は、T-T 2量体として合成され、12量体ポリピリミジンオリゴヌクレオチドの中間に一度組み込まれる。GまたはHのいずれかを含むオリゴヌクレオチドはいずれも、修飾されていない参照オリゴヌクレオチドに比べ、相補的ssRNAおよびssDNAに対して安定性の非常に低い2重らせんを形成した (J. Wang および M. D. Matteucci, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1997, 7, 229)。

## 【0019】

アミド型およびスルホンアミド型(IおよびJ)ヌクレオシド間結合の一部としてC-2', C-3' -メタノ-橋かけを有する2環式[3.1.0]ヌクレオシドを含む2量体が、合成されオリゴヌクレオチドに組み込まれている。これらの類似体の1個以上を含むオリゴヌクレオチドは、修飾されていない天然の参照オリゴヌクレオチドに比べ、 $T_m$ が非常に低下した (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peach, Y. S. Sanghvi および G. Just, Synlett, 1997, 378)。

## 【0020】

中間にホルムアセタール結合および2環式[3.3.0]グルコース誘導ヌクレオシド類似体(K)を有する3量体は、合成され、オリゴヌクレオチドの3'-末端に連結される。相補的ssRNAに対する $T_m$ は、参照配列に比べると4°C低く、3'-末端に2個の2', 5'-ホルムアセタール結合を有する配列に比べると1.5°C低かった (C. G. Yannopoulos, W. Q. Zhou, P. Nower, D. Peach, Y. S. Sanghvi および G. Just, Synlett, 1997, 378)。

## 【0021】

ごく最近、3環式ヌクレオシド類似体からなるオリゴマー(L)において、天然のDNAに比べ、2重らせん安定性が増大したことが報告されている (R. Steffens および C. Leumann (Poster SB-B4), Chimia, 1997, 51, 436)。

## 【0022】

付加的なC-2', C-3' に結合した6員環(MおよびN)あるいは5員環(O)を有する3個の2環式 ([4.3.0] および [3.3.0]) ヌクレオシドがT-類似体として

合成されている。2環式ヌクレオシドMおよびNは、14量体オリゴ-T配列に一度および二度組み込まれる。相補的ssRNAおよびssDNAに対するTmは、修飾されていない参考配列に比べ、1つの修飾につき6~10°C低下した。類似体Oの完全に修飾されたオリゴヌクレオチドでは、参照DNAオリゴヌクレオチドに比べ、相補的RNAオリゴヌクレオチドに対して1つの修飾につき約1.0 °C Tm が上昇した。また、完全に修飾された配列は、修飾されていない参考配列に比べ、ヘビ毒ホスホジエステラーゼ加水分解に対して実質的により安定であった。しかしながら、Oの類似体が最大で4個まで組み込まれた、部分的に修飾されたオリゴヌクレオチドは、対応する修飾されていないオリゴヌクレオチドよりも熱安定性が低かった。類似体Oを含む全てのオリゴヌクレオチド（完全に修飾されたオリゴヌクレオチドおよび部分的に修飾されたオリゴヌクレオチドの両方）が、修飾されていないオリゴヌクレオチドに比べ、相補的DNAオリゴヌクレオチドに対して実質的に低い熱安定性を示した(P. Nielsen, H. M. Pfundheller, J. Wengel, Chem. Commun., 1997, 826; P. Nielsen, H. M. Pfundheller, J. Wengel, XII International Roundtable: Nucleosides, Nucleotides and Their Biological Applications; La Jolla, California, September 15–19, 1996; Poster PPI 43)。

#### 【0023】

4'-C-ヒドロキシメチルヌクレオシドPから開始して、2環式ウリジンヌクレオシド類似体Qに付加的なO-2',C-4'-五員環を含有させる試みは、失敗した(K. D. Nielsen, Specialerapport (Odense University, Denmark), 1995)。

#### 【0024】

現在までのところ、ハイブリッド化特性の非常に高められた合成オリゴヌクレオチド類の製造において有用な立体配座制限されたヌクレオシドの研究はほとんど成功していない。大多数の場合に、これらの類似体を含むオリゴヌクレオチドは、修飾されていないオリゴヌクレオチドに比べ、相補的核酸とより安定性の低い2重らせんを形成する。他の場合には、2重らせんの安定性が少し認められるが、これはDNAターゲットあるいはRNAターゲットにだけ関係するか、あるいは部分的ではなく完全に修飾されたオリゴヌクレオチドに関係するか、もしくは逆もまた同じである。報告されている類似体のほとんどの評価は、G、A および C

核塩基との類似体に関するデータの不足および特異性とハイブリッド化のモードを示すデータの不足によってさらに複雑になっている。多くの場合には、報告されているモノマー類似体の合成は非常に複雑であり、ある場合には、完全に修飾されたオリゴヌクレオチドの合成は、広く用いられているホスホロアミダイト(phosphoramidite)の化学水準と相容れていない。

### 【0025】

#### 発明の要旨

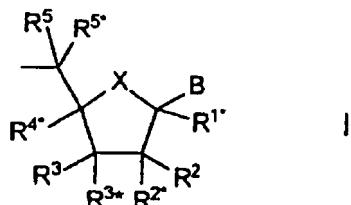
以前に知られているヌクレオシド類似体の欠点から、本発明者はここに新規なヌクレオシド類似体(LNA)を提供し、かつオリゴヌクレオチド類はその中にLNAヌクレオシド類似体を含有する。新規なLNAヌクレオシド類似体は、全ての一般に使用される核塩基を備えており、それによりオリゴヌクレオチド類への組み込み用のヌクレオシド類似体の完全なセットを提供する。以下から明らかなように、LNAヌクレオシド類似体およびLNA修飾オリゴヌクレオチドは、診断および治療の分野において使用されるオリゴヌクレオチド類に対し広範な改善を提供するものである。さらに、LNAヌクレオシド類似体およびLNA修飾オリゴヌクレオチドはまた、ヌクレオシドおよびオリゴヌクレオチドをベースとした診断および治療において、完全に新しい前途を提供する。

### 【0026】

従って、本発明は、一般式I:

### 【0027】

#### 【化9】



### 【0028】

[式中、Xは-O-、-S-、-N(R<sup>n</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-、-O-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-O-、-S-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-S-、-N(R<sup>n</sup>)-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup>)-N(R<sup>n</sup>)-および-

$C(R^6 R^{6*})-C(R^7 R^{7*})-$  から選択され;

【0029】

B は水素、ヒドロキシ、任意に置換された $C_{1-4}$ -アルコキシ、任意に置換された $C_{1-4}$ -アルキル、任意に置換された $C_{1-4}$ -アシリオキシ、核塩基類、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され;

【0030】

P は継続するモノマーへのヌクレオシド間結合のためのラジカル位置、または 5'-末端基を意味し、そのようなヌクレオシド結合または 5'-末端基は任意に置換基  $R^5$  を含有し;

【0031】

置換基  $R^2$ 、 $R^{2*}$ 、 $R^3$  および  $R^{3*}$  の一つは、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または 3'-末端基を意味する基 P' であり、;

【0032】

$R^1^*$ 、 $R^4^*$ 、 $R^5$ 、 $R^{5*}$ 、 $R^6$ 、 $R^{6*}$ 、 $R^7$ 、 $R^{7*}$ 、 $R^N^*$  の存在する置換基から選択される非ジェミナル置換基および P' を意味しない  $R^2$ 、 $R^{2*}$ 、 $R^3$  および  $R^{3*}$  の存在する置換基から選択される非ジェミナル置換基の 1 または 2 の対は各々、 $-C(R^a R^b)$  -、 $-C(R^a)=C(R^a)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R^a)-$  および  $\times C=Z$  [式中、Z は  $-O-$ 、 $-S-$  および  $-N(R^a)-$  から選択され、 $R^a$  および  $R^b$  は各々独立して水素、任意に置換された  $C_{1-12}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{1-12}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルキニル、ヒドロキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシ、 $C_{2-12}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-12}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノ- および ジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノ- および ジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノ- および ジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノカルボニル、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、

$C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは任意に置換されてもよく、ここで2つのジェミナル置換基  $R^a$  および  $R^b$  は、一緒になって任意に置換されたメチレン (=CH<sub>2</sub>) を意味してもよく、ここで  $R^a$ 、 $R^b$  ならびに存在していて P、P' またはピラジカルに含まれていない置換基  $R^{1+}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2+}$ 、 $R^3$ 、 $R^{3+}$ 、 $R^{4+}$ 、 $R^5$ 、 $R^{5+}$ 、 $R^6$  および  $R^{6+}$ 、 $R^7$  および  $R^{7+}$  のいずれかから選択される2つの非ジェミナルまたはジェミナル置換基は、一緒になって上記と同じ種類のピラジカル類から選択された結合したピラジカルを形成してもよい] から選択される1～8の基／原子を含有するピラジカルを意味し；

非ジェミナル置換基の該対は、それにより (i) 該非ジェミナル置換基が結合している原子および (ii) いずれかの介在原子と一緒にになって单環式または二環式のものを形成しがつ

### 【0033】

存在していて P、P' またはピラジカルに含まれていない置換基  $R^{1+}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2+}$ 、 $R^3$ 、 $R^{4+}$ 、 $R^5$ 、 $R^{5+}$ 、 $R^6$  ならびに  $R^{6+}$ 、 $R^7$  および  $R^{7+}$  の各々は、水素、任意に置換された  $C_{1-12}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルキニル、ヒドロキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシ、 $C_{2-12}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-12}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノー およびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノー およびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノー およびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、 $C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リ

ポーター基およびリガンドから独立して選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは任意に置換されていてもよく、ここで、2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソ、チオオキソ、イミノまたは任意に置換されたメチレンを意味してもよく、または任意に  $-O-$ 、 $-S-$  および  $-(NR^w)-$  から選択される1以上のヘテロ原子/基により割り込まれかつ/または末尾をなしている1-5の炭素原子アルキレン鎖からなるスピロビラジカルを一緒になって形成してもよく、ここで  $R^w$  は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択され、かつここで2つの隣接した(非ジェミナルな)置換基は二重結合を生じる付加的な結合を意味し;かつ  $R^w$  は存在するがビラジカル中に含有されないとき、水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択され;

#### 【0034】

ただし、

- (i) LNA が二環式ヌクレオシド類似体であるとき、 $R^2$  および  $R^3$  は一緒になって  $-O-CH_2-CH_2-$  および  $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$  から選択されるビラジカルを意味せず；
- (ii) LNA が二環式ヌクレオシド類似体であるとき、 $R^3$  および  $R^5$  は一緒になって  $-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-$  から選択されるビラジカルを意味せず；
- (iii) LNA が3環式ヌクレオシド類似体であるとき、 $R^3$ 、 $R^5$  および  $R^5^*$  は一緒になってトリラジカル  $-CH_2-CH(-)-CH_2-$  を意味せず；
- (iv) LNA が二環式ヌクレオシド類似体であるとき、 $R^1^*$  および  $R^6^*$  は一緒になってビラジカル  $-CH_2-$  を意味せず；かつ
- (v) LNA が二環式ヌクレオシド類似体であるとき、 $R^4^*$  および  $R^6^*$  は一緒になってビラジカル  $-CH_2-$  を意味しない]

#### 【0035】

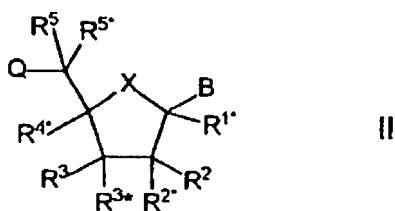
のヌクレオシド類似体(以後、「LNA」と称する)ならびにその塩基性塩および酸付加塩の少なくとも一つからなるオリゴマー類に関する。

#### 【0036】

さらにこの発明は、一般式II：

#### 【0037】

【化10】



【0038】

[式中、置換基 **B** は核塩基、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され；

【0039】

X は  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^{\bullet})-$  および  $-C(R^6R^6\cdot)-$  から選択され；

【0040】

置換基  $R^2$ 、 $R^{2\bullet}$ 、 $R^3$  および  $R^{3\bullet}$  の一つは基  $Q^\circ$  であり；

【0041】

$Q$  および  $Q^\circ$  の各々は、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、Act-O-、メルカプト、Prot-S-、Act-S-、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、Prot-N( $R^H$ )-、Act-N( $R^H$ )-、モノ- またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、アミノメチル、Prot-N( $R^H$ )-CH<sub>2</sub>-、Act-N( $R^H$ )-CH<sub>2</sub>-、カルボキシメチル、スルホノメチル（ここで、Prot はそれぞれ  $-OH$ 、 $-SH$  および  $-NH(R^H)$  のための保護基であり、Act はそれぞれ  $-OH$ 、 $-SH$  および  $-NH(R^H)$  のための活性化基であり、 $R^H$  は水素および  $C_{1-6}$ -アルキルから選択される）から独立して選択され；

【0042】

- (i)  $R^2$ \* および  $R^4$ \* は一緒になって、 $-O-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$  および  $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$  から選択されるピラジカルを意味し；
- (ii)  $R^2$  および  $R^3$  は一緒になって、 $-O-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるピラジカルを意味し；
- (iii)  $R^2$ \* および  $R^3$  は一緒になって、 $-O-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるピラジカルを意味し；
- (iv)  $R^3$  および  $R^4$ \* は一緒になって、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるピラジカルを意味し；
- (v)  $R^3$  および  $R^5$  は一緒になって、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるピラジカルを意味し； または
- (vi)  $R^1$ \* および  $R^4$ \* は一緒になって、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるピラジカルを意味し；
- (vii)  $R^1$ \* および  $R^2$ \* は一緒になって、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるピラジカルを意味し；

## 【0043】

ここで、各  $R^*$  は水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ- またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、かつ/または2つの隣接する(非ジェミナルな)  $R$

\* は、一緒になって二重結合を意味してもよく、かつ r および s の各々は 0 ~ 3 であり、ただし r+s の合計は 1 ~ 4 であり；

### 【0044】

Q, Q<sup>\*</sup> またはピラジカル中に含有されない置換基 R<sup>1\*</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>2\*</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4\*</sup>, R<sup>5</sup> および R<sup>5\*</sup> の各々は、水素、任意に置換された C<sub>1-12</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>2-12</sub>-アルケニル、任意に置換された C<sub>2-12</sub>-アルキニル、ヒドロキシ、C<sub>1-12</sub>-アルコキシ、C<sub>2-12</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-12</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-12</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノ- およびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノ- およびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)-アミノカルボニル、アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、モノ- およびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ-C<sub>1-6</sub>-アルキル-アミノカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、C<sub>1-6</sub>-アルカノイルオキシ、スルホノ、C<sub>1-6</sub>-アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、ここでアリールおよびヘテロアリールは任意に置換されてもよく、ここで、2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソ、チオオキソ、イミノまたは任意に置換されたメチレンを意味してもよく、または -O-, -S-, および -(NR<sup>n</sup>)- から選択される 1 以上のヘテロ原子/基により任意に割り込まれかつ/または末尾をなしている 1~5 の炭素原子アルキレン鎖からなるスピロピラジカルを一緒になって形成してもよく、ここで R<sup>n</sup> は水素および C<sub>1-4</sub>-アルキルから選択され、ここで 2 つの隣接する（非-ジェミナルな）置換基は二重結合を生じる付加的な結合を意味してもよく；かつ R<sup>n\*</sup> は、存在するがピラジカル中に含有されないときは、水素および C<sub>1-4</sub>-アルキルから選択され；

### 【0045】

ただし、第 1 の条付として、

(i) R<sup>2</sup> および R<sup>3</sup> は一緒になって -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- および -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- から

選択されるビラジカルを意味せず；かつ

(ii)  $R^3$  および  $R^5$  は一緒になって  $-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-$  および  $-O-Si(C'Pr)_2-O-$   
 $-Si(C'Pr)_2-O-$  から選択されるビラジカルを意味せず；

ただし、第2の条件として、オリゴヌクレオチド合成で普及している条件下で反応性ないかなる化学基（核塩基を含む）も、任意に保護された官能基である]

のヌクレオシド類似体（以後、LNA）ならびにそれらの塩基性塩および酸付加塩に関する。

#### 【0046】

この発明は、オリゴマー製造用ヌクレオシド類似体(LNA)の使用ならびに診断、分子生物学研究および治療におけるオリゴマーおよびヌクレオシド類似体(LNA)の使用にも関する。

#### 【0047】

(この発明の詳細な説明)

ここで使用されるとき、用語「LNA」（ロックされたヌクレオシド類似体）は、この発明のオリゴマー（一般式I）に組みこまれたか、または分離した化学種（一般式II）として、この発明の2環式または3環式ヌクレオシド類似体を意味する。用語「モノマー性 LNA」は、特に後者の場合を意味する。

#### 【0048】

(オリゴマーおよびヌクレオシド類似体)

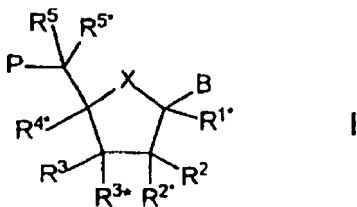
上述のとおり、この発明は、i.a. 1 またはそれ以上の2環式、3環式または多環式ヌクレオシド類似体（これ以後、「LNA」と称する）からなる新規オリゴマー類（オリゴヌクレオチド類）に関する。例えば公知ヌクレオシドの代わりに、または追加として、そのような LNA の組み込みにより、オリゴヌクレオチドに興味深い非常に有益な物性を与えることが見出されている。2環式および3環式、特に2環式、LNA は、この発明の範囲内で特に興味深いようである。

#### 【0049】

オリゴマー（オリゴヌクレオチド）中に組みこまれた可能な LNA の各々は、一般式 I

#### 【0050】

## 【化11】



## 【0051】

[ここで、Xは、-O-（フラノースモチーフ）、-S-、-N(R<sup>n</sup><sup>\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup><sup>\*</sup>)-、-O-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup><sup>\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup><sup>\*</sup>)-O-、-S-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup><sup>\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup><sup>\*</sup>)-S-、-N(R<sup>n</sup><sup>\*</sup>)-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup><sup>\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup><sup>\*</sup>)-N(R<sup>n</sup><sup>\*</sup>)- および -C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup><sup>\*</sup>)-C(R<sup>7</sup>R<sup>7</sup><sup>\*</sup>)-（ここで、R<sup>6</sup>、R<sup>6</sup><sup>\*</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>7</sup><sup>\*</sup> および R<sup>n</sup><sup>\*</sup> は以下に定義するとおりである）から選択される]

を有する。従って、オリゴマー中に組みこまれた LNA は、2環式、3環式または多環式構造の必須部位として、5員または6員環のいずれかからなってもよい。5員環 (X = -O-、-S-、-N(R<sup>n</sup><sup>\*</sup>)-、-C(R<sup>6</sup>R<sup>6</sup><sup>\*</sup>)-) は、それらが天然で生じるヌクレオシドの天然のフラノース環として（しかし、1以上のビラジカル（以下参照）の導入によりロックされ）本質的に同じ配座を占めることができるという点において特に興味深いと、考えられる。可能な 5員環の中で、X が -O-、-S- および -N(R<sup>n</sup><sup>\*</sup>)- を意味する情況が特に興味深いようであり、X が -O- である情況が特に興味深いようである。

## 【0052】

置換基 B は、オリゴマーが DNA または RNA と複合体を形成するとき、DNA または RNA、特に DNA または RNA の核塩基と相互作用（例えば水素結合または共有結合または電子的相互作用により）しうる基を意味する。代わりとして、置換基 B は標識またはレポーターとして行動する基を意味するか、または置換基 B は DNA または RNA と相互作用を有さないか、ほとんど有さないと予想される基（例えば水素）を意味してもよい。従って、置換基 B は、水素、ヒドロキシ、任意に置換された C<sub>1-4</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-4</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>1-4</sub>-アシルオキシ、核塩基、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガン

ドから選択されるのが好ましい。

### 【0053】

本文中で、用語「核塩基」は、天然で生じる核塩基および非天然で生じる核塩基をカバーする。以前は「非天然で生じる」と思われていた様々な核塩基が、自然界でその後見出されていることは当該分野の当業者には明らかなるはずである。従って、「核塩基」には、公知のプリンおよびピリミジンヘテロ環のみならず、そのヘテロ環式類似体および互変異性体も含む。核塩基の実例としては、アデニン、グアニン、チミン、シトシン、ウラシル、プリン、キサンチン、ジアミノプリン、8-オキソ- $N^6$ -メチルアデニン、7-デアザキサンチン、7-デアザグアニン、 $N^4,N^6$ -エタノシトシン、 $N^6,N^6$ -エタノ-2,6-ジアミノプリン、5-メチルシトシン、5-(C<sup>3</sup>-C<sup>6</sup>)-アルキニルシトシン、5-フルオロウラシル、5-プロモウラシル、ブソイドインシトシン、2-ヒドロキシ-5-メチル-4-トリアゾロピリジン、インシトシン、イソグアニン、イノシンおよび米国特許第5,432,272号(Bennerら)に記載の「非天然で生じる」核塩基である。用語「核塩基」は、これらのすべておよびいずれの例ならびにその類似体および互変異性体をカバーするものである。特に興味深い核塩基は、アデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシルである。これらは、ヒトの治療および診断適用に関連して天然に存在する核塩基として考えられている。

### 【0054】

ここで使用するとき、用語「DNA インターカレーター」は、DNA または RNA らせん、二重らせんまたは三重らせん内にインターカレートし得る基を意味する。DNA インターカレーターの官能基部分の例としては、アクリジン、アントラセン、アントラキノンのようなキノン、インドール、キノリン、イソキノリン、ジヒドロキノン、アントラサイクリン、テトラサイクリン、メチレンブルー、アントラサイクリノン、プソラレン、クマリン、エチジウム-ハライド、ダインマイシン(dynemicin)、1,10-フェナントロリン-銅のような金属錯体、カルケアマイシン(calicheamicin)のようなトリス(4,7-ジフェニル-1,10-フェナントロリン)ルテニウム-コバルト-エンジイン、ポルフィリン、ディスタマイシン(dis tamycin)、ネトロップシン(netropcin)、ビオローゲン、ダウノマイシンである。

。特に興味深い例は、アクリジン、アントラキノンのようなキノン、メチレンブ  
ルー、プソラレン、クマリンおよびエチジウム-ハライドである。

### 【0055】

本文中で、用語「光化学的に活性な基」は、光による照射によって化学反応が  
進行し得る化合物をカバーする。そのような官能基の実例としては、キノン、特に  
6-メチル-1,4-ナフトキノン、アントラキノン、ナフトキノン および 1,4-ジ  
メチル-アントラキノン、ジアジリン、芳香族アジド、ベンゾフェノン、プソラ  
レン、ジアゾ化合物ならびにジアジリノ化合物である。

### 【0056】

本文中で、「熱化学的に反応性な基」は、熱化学的に誘導された、他の基との  
共有結合形成が進行し得る官能基として定義される。熱化学的に反応性な基の官  
能基部分の実例は、カルボン酸、活性化エステルのようなカルボン酸エステル、  
酸フロオライド、酸クロライド、酸プロマイドおよび酸アイオダイドのようなカル  
ボン酸ハライド、カルボン酸アジド、カルボン酸ヒドラジド、スルホン酸、ス  
ルホン酸エステル、スルホン酸ハライド、セミカルバジド、チオセミカルバジド  
、アルデヒド、ケトン、第1級アルコール、第2級アルコール、第3級アルコー  
ル、フェノール、アルキルハライド、チオール、ジスルフィド、第1級アミン、  
第2級アミン、第3級アミン、ヒドラジン、エポキシド、マレイミドならびにボ  
ロン酸 (boronic acid) 誘導体である。

### 【0057】

本文中で、用語「キレート基」とは、1以上の結合部位を含み、同時に1以上  
の結合部位で別の分子、原子またはイオンとしばしば結合する分子を意味する。  
キレート基の官能部分の例としては、イミノジ酢酸、ニトリロトリ酢酸、エチレ  
ンジアミンテトラ酢酸 (EDTA)、アミノホスホン酸等である。

### 【0058】

本文中で、用語「リポーター基」は、それ自体によりまたは検出シリーズの一  
部として検出可能な基を意味する。リポーター基の官能基部分の例としては、ビ  
オチン、ジゴキシゲニン (digoxigenin) 、蛍光基 [ある波長の電磁照射、例え  
ば光またはX-線を吸収することが可能で、その後、より長波長な放射線として

吸収されたエネルギーを再放射する基；実例としては、ダンシル(5-ジメチルアミノ)-1-ナフタレンスルホニル)、DOXYL (N-オキシ-4,4-ジメチルオキサゾリジン)、PROXYL (N-オキシル-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン)、TEMPO (N-オキシリ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン)、ジニトロフェニル、アクリジン、クマリン (coumarines)、Cy3 および Cy5 (バイオロジカル・ディテクション・システム・インクの商標)、エリトロシン (erytrosine)、クマリン酸 (coumaric acid)、ウンベリフェロン (umbelliferone)、テキサスレッド、ローダミン、テトラメチルローダミン、ロックス (Rox)、7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1-ジアゾール (NBD)、ピレン、フルオレセイン、ユウロピウム、ルテニウム、サマリウムおよび他の希土類金属である]、放射性同位体標識、化学ルミネセンス標識（化学反応中に光の放出により検出可能な標識）、スピノ標識 [フリーラジカル（例えば、置換された有機ニトロキシド）または電子スピノ共鳴分光法の使用により検出可能な生物分子に結合した他の常磁性プローブ（例えば、 $Cu^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ ）]、酵素（ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼおよびグルコースオキシダーゼのような）、抗原、抗体、ハプテン（抗体と結合することができる基、しかしそれ自体は免疫応答を開始させることはできない、ペプチドおよびステロイドホルモンのようなもの）、脂肪酸残基、ステロイド部分（コレステリル）、ビタミン A、ビタミン D、ビタミン E、特定なレセプター用葉酸ペプチド、エンドサイトーシスを媒介する基、表皮成長因子（EGF）、プラジキニンおよび血小板由来増殖因子（PDGF）のような細胞膜透過用輸送システムである。特に興味深い例は、ビオチン、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、ジニトロフェニル、ジゴキシゲニン、ルテニウム、ユウロピウム、Cy5、Cy3 等である。

### 【0059】

本文中で、「リガンド」は結合するものを意味する。リガンドは、芳香族基（ベンゼン、ピリジン、ナフタレン、アントラセンおよびフェナントレンのような）、ヘテロ芳香族基（チオフェン、フラン、テトラヒドロフラン、ピリジン、ジオキサンおよびピリミジンのような）、カルボン酸、カルボン酸エステル、カルボン酸ハライド、カルボン酸アジド、カルボン酸ヒドラジド、スルホン酸、スルホ

ン酸エステル、スルホン酸ハライド、セミカルバジド、チオセミカルバジド、アルデヒド、ケトン、第1級アルコール、第2級アルコール、第3級アルコール、フェノール、アルキルハライド、チオール、ジスルフィド、第1級アミン、第2級アミン、第3級アミン、ヒドラジン、エポキシド、マレイミド、酸素原子、窒素原子および／または硫黄原子のような1以上のヘテロ原子で任意に割り込まれるかまたは末尾をなすか、芳香族またはモノ／ポリ不飽和炭化水素、ポリエチレングリコールのようなオリゴ／ポリアミド、ペプチド、オリゴ／ポリサッカライド、オリゴ／ポリホスフェート、毒素、抗生物質、細胞毒 (cell poisons) およびステロイドを任意に含有する  $C_1-C_2$ 。アルキル基ならびに「親和性リガンド」、すなわち、特定のタンパク質、抗生物質、ポリーおよびオリゴサッカライドならびに他の生体分子に関して部位に特定な親和性を有する官能基または生体分子のような官能基からなってもよい。

#### 【0060】

DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドの上述の特定な例が、該基の「活性な／官能基」部分に相当することは、当該分野の当業者には明らかであろう。当該分野の当業者にとって、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドは、M-K-の形態 [式中、M は該基の「活性な／官能基」部分であり、K は「活性な／官能基」部分がそれにより 5- または 6- 貞環に結合するスペーサーである] で典型的に表されることは、さらに明らかである。したがって、B が DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択される場合、基 B は、M-K- の形態 [M は DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドそれぞれの「活性な／官能基」部分であり、K は 5- または 6- 貞環と「活性な／官能基」部分の間の、1~50 原子、好ましくは 1~30 原子、特に 1~15 原子からなる任意なスペーサーである] を有することが理解されるであろう。

#### 【0061】

本文中において、用語「スペーサー」は、熱化学的および光化学的に不活性な距離形成 (distance-making) 基を意味し、上記で定義した種類の 2 以上の異なる部分に結合するために使用される。スペーサーは、その疎水性、親水性、分子柔軟性および長さを含む様々な特徴を基にして選択される(例えば、Hermanson ら、"Immobilized Affinity Ligand Techniques", Academic Press, San Diego, California (1992), p. 137-ff 参照)。通常、スペーサーの長さは、約 400 Å より短く、ある適用においては 100 Å より短いのが好ましい。スペーサーは、したがって、1 以上の酸素原子、窒素原子および/または硫黄原子のようなヘテロ原子で任意に割り込まれるかまたは末尾をなす炭素原子鎖からなる。従って、スペーサー K は 1 以上のアミド、エステル、アミノ、エーテルおよび/またはチオエーテル官能性、および任意に芳香族またはモノ/ポリ不飽和な炭化水素、ポリエチレングリコールのようなポリオキシエチレン、ポリ- $\beta$ -アラニン、ポリグリシン、ポリリジンのようなオリゴ/ポリアミド、ならびに一般的ペプチド、オリゴサッカライド、オリゴ/ポリホスフェートからなってもよい。さらに、スペーサーはそれらの組み合わせた単位からなってもよい。スペーサーの長さは 5- または 6-員環に関連して、該基の「活性な/官能基」部分の望ましいまたは必要な位置および空間的な配向を考慮にいれて、異なっていてもよい。特に興味深い具体例においては、スペーサーは化学的に開裂できる基を含む。そのような化学的に開裂できる基の例には、還元的条件下で開裂可能なジスルフィド基、ペプチダーゼにより開裂可能なペプチドフラグメントなどを含む。

#### 【0062】

この発明の具体例の一つにおいて、該基の「活性な/官能基」部分が 5- または 6- 員環に直接結合できるように、K は単結合を意味する。

#### 【0063】

好ましい具体例において、一般式 I および II 中の置換基 B は、核塩基、特にアデニン、グアニン、チミン、シトシンおよびウラシルから選択されるのが好ましい。

#### 【0064】

この発明のオリゴマー (式 I) において、P は、継続するモノマーへ結合する

ヌクレオシド間のラジカル位、または 5'-末端基を意味する。該 LNA が 5'-末端「モノマー」でないときに第 1 の可能性があてはまり、一方該 LNA が 5'-末端「モノマー」であるとき後者の可能性があてはまる。そのようなヌクレオシド間結合または 5'-末端基には置換基 R<sup>s</sup> (または置換基 R<sup>s\*</sup>) を等しく適用可能である)を含んでもよく、それにより基 P に結合する二重結合が形成することは(また、以下のヌクレオシド間結合および 5'-末端基の定義からも明らかである)理解されるべきである。(5'-末端とは、ヌクレオシド中のリボース部分の 5' 炭素原子に相当する位置を意味する。)

#### 【0065】

一方、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合または 3'-末端基 (P\*) は、置換基 R<sup>2</sup>、R<sup>2\*</sup>、R<sup>3</sup> および R<sup>3\*</sup> の一つにより定義される位置から、好ましくは置換基 R<sup>3</sup> および R<sup>3\*</sup> の一つにより定義される位置から開始してもよい。同様に、該 LNA が 3'-末端「モノマー」でないとき、第 1 の可能性があてはまり、一方、該 LNA が 3'-末端「モノマー」であるとき後者の可能性があてはまる。(3'-末端とは、ヌクレオシド中のリボース部位の 3' 炭素原子に相当する位置を意味する。)

#### 【0066】

本文中で、用語「モノマー」は、天然に存在するヌクレオシド、天然には存在しないヌクレオシド、PNA 等および LNA に関するもの。従って、用語「継続するモノマー」は、5'-末端方向での隣接するモノマーに関連し、「先行するモノマー」は、3'-末端方向での隣接するモノマーに関連する。そのような継続するモノマーおよび先行するモノマーは、LNA モノマーの位置から見られ、天然に存在するヌクレオシドまたは天然には存在しないヌクレオシドまたはさらに LNA モノマーでさえあってもよい。

#### 【0067】

その結果、本文中で(上記定義から導き出されるように)、用語「オリゴマー」は 1 以上の LNA(類)の組込みにより修飾されたオリゴヌクレオチドを意味する。

#### 【0068】

本発明の重要な部分は、一般式 I で表される 5- または 6-員環に縮合した 1

以上の環の存在である。従って、 $R^1^*$ 、 $R^4^*$ 、 $R^5$ 、 $R^5^*$ 、 $R^6$ 、 $R^6^*$ 、 $R^7$ 、 $R^7^*$ 、 $R^N^*$ の存在する置換基から選択される非ジェミナル置換基および $P^*$ を意味しない $R^2$ 、 $R^2^*$ 、 $R^3$ および $R^3^*$ の存在する置換基から選択される非ジェミナル置換基の1または2の対は各々、1~8の基/原子、好ましくは1~4の基/原子からなり、 $-C(R^a R^b)-$ 、 $-C(R^a)=C(R^a)-$ 、 $-C(R^a)=N-$ 、 $-O-$ 、 $-Si(R^a)_2-$ 、 $-S-$ 、 $-SO_2-$ 、 $-N(R^a)-$ および $>C=Z$ から独立して選択されるビラジカルを意味する。(用語「存在する」は、置換基、すなわち $R^6$ 、 $R^6^*$ 、 $R^7$ 、 $R^7^*$ 、 $R^N^*$ の幾つかの存在が、Xがそのような置換基を含むかどうかに依存することを示す。)

### 【0069】

ビラジカル(類)を構成する基において、Zは $-O-$ 、 $-S-$ および $-N(R^a)-$ から選択され、 $R^a$ および $R^b$ は各々水素、任意に置換された $C_{1-12}$ -アルキル、任意に置換された $C_{2-12}$ -アルケニル、任意に置換された $C_{2-12}$ -アルキニル、ヒドロキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシ、 $C_{2-12}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-12}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、 $C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド(ここで、後者の基には置換基B用に定義されたようなスペーサーを含んでもよい)【ここでアリールおよびヘテロアリールは任意に置換されてもよい】から独立して選択される。そのうえ、2つのジェミナル置換基 $R^a$ および $R^b$ は一緒になって任意に置換されたメチレン(アリール用の任意な置換基として定義された置換基で1または2回任意に置換された $=CH_2$ )を意味してもよく、 $R^a$ 、 $R^b$ 、ならびに置換基 $R^1^*$ 、 $R^2$ 、 $R^2^*$ 、 $R^3$ 、 $R^3^*$ 、 $R^4^*$ 、 $R^5$ 、 $R^5^*$ 、 $R^6$ および $R^6^*$ 、 $R^7$ 、および $R^7^*$ 【

それらは存在し、P、P' またはビラジカル(類)に含まれない] のいずれかから選択された2つの非ジェミナルなまたはジェミナル置換基は一緒になって、上記で定義したのと同じ種類のビラジカル類から選択された結合したビラジカルを形成してもよい。非ジェミナル置換基の対の各々は、それによって、(i)非ジェミナル置換基が結合している原子および(ii)いずれかの介在原子と一緒にになって単環式または2環式のものを形成することは明らかであろう。

### 【0070】

5- または 6-員環の環原子と結合しているビラジカルは、置換基 R<sup>5</sup> および R<sup>5\*</sup> の包含によりヌクレオシド間結合と望ましくない立体的相互作用を生じるのが好ましいと考えられる。従って、1 または 2 のビラジカル(類)をそれぞれ構成する、非ジェミナル置換基の1 または 2 の対が、R<sup>1\*</sup>、R<sup>4\*</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>6\*</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>7\*</sup>、R<sup>8\*</sup> の存在する置換基ならびに R<sup>2</sup>、R<sup>2\*</sup>、R<sup>3</sup> および R<sup>3\*</sup> [ P' を意味しない] の存在する置換基から選択されるのが好ましい。

### 【0071】

オリゴマー中に組み込まれたLNA が、(2の) 非ジェミナル置換基の1対よりもなる1つのビラジカルのみからなるのが好ましい。特に、R<sup>3\*</sup> が P' を意味し、かつビラジカルが R<sup>2\*</sup> と R<sup>4\*</sup> の間または R<sup>2</sup> と R<sup>3</sup> の間に形成されるのが好ましい。

### 【0072】

これにより、本発明は、以下：

- (i) R<sup>2</sup> および R<sup>3</sup> は一緒になって、LNA が2環式ヌクレオシド類似体であるとき、-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- および -O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；
- (ii) R<sup>3</sup> および R<sup>5</sup> は一緒になって、LNA が2環式ヌクレオシド類似体であるとき、-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-、-O-CH<sub>2</sub>- から選択されるビラジカルを意味し；
- (iii) R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup> および R<sup>5\*</sup> は一緒になって、LNA が3環式 ヌクレオシド類似体であるとき、トリラジカル -CH<sub>2</sub>-CH(-)-CH<sub>2</sub>- を意味し；
- (iv) R<sup>1\*</sup> および R<sup>6\*</sup> は一緒になって、LNA が2環式 ヌクレオシド類似体であるとき、ビラジカル -CH<sub>2</sub>- を意味し；または
- (v) R<sup>4\*</sup> および R<sup>6\*</sup> が一緒になって、LNA が2環式ヌクレオシド類似体である

とき、ビラジカル  $-CH_2-$  を意味する

[ただし、そのような2-または3-環式ヌクレオシド類似体がここで定義された新規な LNA の1またはそれ以上と組み合わさったものを除く]；  
の2-または3-環式ヌクレオシド類似体からなるオリゴマー類に関しないことは、  
(特に、公知な 2-または3-環式ヌクレオシド類似体を充分考慮した上で - 「発明の背景」 参照)理解されるであろう。

#### 【0073】

本文中で、すなわちこの記載および請求項において、ビラジカルの配向は、左手側が少ない数の置換基を表し、右手側が大きい数の置換基を表すようになる、従って  $R^3$  および  $R^5$  が一緒になってビラジカル「 $-O-CH_2-$ 」を意味するとき、酸素原子は  $R^3$  を表し、従って酸素原子は、例えば  $R^3$  の位置に結合しており、メチレン基は  $R^5$  を表すと考えられる。

#### 【0074】

この発明によるオリゴマー中に組みこまれた LNA (類) 中のビラジカル(類)の構造の数多くの興味深い可能性を考慮すると、非ジェミナル置換基の対により構成されるビラジカル (類) は、 $-(CR^* R^*)_r -Y-(CR^* R^*)_s -$ 、 $-(CR^* R^*)_r -Y-(CR^* R^*)_s -Y-$ 、 $-Y-(CR^* R^*)_r , s -Y-$ 、 $-Y-(CR^* R^*)_r -Y-(CR^* R^*)_s -$ 、 $-(CR^* R^*)_r , s - -Y-$ 、 $-Y-Y-$  - [ここで、各 Y は  $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-Si(R^*)_2-$ 、 $-N(R^*)-$ 、 $>C=O$ 、 $-C(=O)-N(R^*)-$  および  $-N(R^*)-C(=O)-$  から独立して選択され、各  $R^*$  は、水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、かつ/または 2つの隣接した (非ジェミナルな)  $R^*$  は一緒になって二重結合を意味してもよい；かつ r と s の各々は 0~4 であり、ただし r+s の合計は 1~5 である] から選択されるのが好ましいと考えられる。特に興味深い関係は、各ビラジカルが  $-Y-$ 、 $-(CR^* R^*)_r , s -$ 、 $-(CR^* R^*)_r -Y-(CR^* R^*)_s -$  および  $-Y-(CR^* R^*)_r , s -Y-$  から独立して選択され、r および s の各々は 0~3 であり、ただし r+s の合計は 1~4 であるものである。

## 【0075】

LNA(類)中でのビラジカルの位置を考慮すると、以下の関係、すなわち:  $R^2$ \* および  $R^4$ \* は一緒になって、 $-Y-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-Y-(CR^* R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^* R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^2$  および  $R^3$  は一緒になって  $-Y-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-Y-(CR^* R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^* R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^2$ \* および  $R^3$  は一緒になって  $-Y-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-Y-(CR^* R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^* R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^3$  および  $R^4$ \* は一緒になって  $-Y-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-Y-(CR^* R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^* R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^1*$  および  $R^4$ \* は一緒になって  $-Y'-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-Y-(CR^* R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^* R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^1*$  および  $R^2$ \* は一緒になって  $-Y-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-Y-(CR^* R^*)_s-$  および  $-Y-(CR^* R^*)_{r+s}-Y-$  から選択されるビラジカルを意味する; ここで、 $r$  および  $s$  の各々は 0~3 であり、ただし  $r+s$  の合計が 1~4 であり、 $Y$  は上記のとおりであり、かつ  $Y'$  は  $-NR^*-C(=O)-$  および  $-C(=O)-NR^*-$  から選択されることが特に興味深いことが(予備的な所見(実施例参照)をもとに)考えられる。

## 【0076】

特に興味深いオリゴマーは、以下の特徴の一つがオリゴマー中の少なくとも 1 つの LNA に適用されるものである:  $R^2$ \* および  $R^4$ \* は一緒になって、 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-N(R^*)-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s+1}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-O-$ 、 $-O-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$ 、 $-N(R^*)-(CR^* R^*)_{r+s}-S-$  および  $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^2$  および  $R^3$  は一緒になって  $-O-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^2$ \* および  $R^3$  は一緒になって  $-O-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$

$s$  - および  $-(CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^3$  および  $R^4^*$  は一緒になって  $-(CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s -$ 、 $-(CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $-(CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^3$  および  $R^5$  は一緒になって  $-(CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s -$ 、 $-(CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $-(CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるビラジカルを意味し;  $R^1^*$  および  $R^4^*$  は一緒になって  $-(CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s -$ 、 $-(CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $-(CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるビラジカルを意味し; または  $R^1^*$  および  $R^2^*$  は一緒になって  $-(CR^* R^*)_r - O - (CR^* R^*)_s -$ 、 $-(CR^* R^*)_r - S - (CR^* R^*)_s -$  および  $-(CR^* R^*)_r - N(R^*) - (CR^* R^*)_s -$  から選択されるビラジカルを意味する; ここで、 $r$  および  $s$  の各々は 0~3 である、ただし  $r+s$  の合計は 1~4 であり、 $R^6$  は水素または  $C_{1-4}$ -アルキルを意味する。

## 【0077】

$R^*$  の一つが、水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択されるのがさらに好ましく、残りの置換基  $R^*$  はいずれも水素である。

## 【0078】

好ましい具体例の一つにおいて、少なくとも一つの LNA 中のビラジカル中の一つの基  $R^*$  は、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド(ここで後者の基は置換基 B 用に定義されたようなスペーサーを含んでもよい)から選択される。

## 【0079】

存在するが  $P$ 、 $P^*$  またはビラジカル(類)中に含まれない置換基  $R^1^*$ 、 $R^2$ 、 $R^2^*$ 、 $R^3$ 、 $R^4^*$ 、 $R^5$ 、 $R^5^*$ 、 $R^6$  ならびに 置換基  $R^6^*$ 、 $R^7$  および  $R^7^*$  に関して、これらは、水素、任意に置換された  $C_{1-12}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-12}$ -アルキニル、ヒドロキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシ、 $C_{2-12}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-12}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-12}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカ

ルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、 $C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、アジド、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、ハロゲン、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド(後者の基は置換基 B用に定義したようなスペーサーを含んでもよい) [ここで、アリールおよびヘテロアリールは、任意に置換されていてもよく、ここで2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソ、チオキソ、イミノまたは任意に置換されたメチレンを意味するか、または一緒になって、-O-, -S- および -(NR<sup>n</sup>)- [ここで R<sup>n</sup> は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から選択される1以上のヘテロ原子/基で、任意に割り込まれかつ/または末尾をなされた1~5の炭素原子アルキレン鎖からなるスピロビラジカルを形成してもよく、ここで、2つの隣接した(非ジェミナルな)置換基は二重結合を生じさせる付加的な結合を意味してもよく; かつここで、存在するがビラジカル中に含まれないとき、R<sup>n</sup>\* は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から独立して選択される。

### 【0080】

存在するが P、P\* またはビラジカル中に含まれない、LNA の置換基 R<sup>1+</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>2+</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>3+</sup>、R<sup>4+</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5+</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>6+</sup>、R<sup>7</sup> および R<sup>7+</sup> の各々は、水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキル-カルボニルアミノ、カルバミド、アジド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドならびにハロゲン [ここで、2つのジェミナル置換基は、一緒

になってオキソを意味してもよく、ここで、 $R^N^+$  は存在するがビラジカル中に含まれないとき、水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から独立して選択されるのが好ましい。

#### 【0081】

この発明の好ましい具体例においては、X は、-O-、-S- および -NR<sup>N</sup><sup>+</sup>- から選択され、特に -O- であり、存在するが P、P\* またはビラジカル中に含まれない、LNA の置換基 R<sup>1</sup><sup>\*</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>2</sup><sup>\*</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>3</sup><sup>\*</sup>、R<sup>4</sup><sup>\*</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>5</sup><sup>\*</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>6</sup><sup>\*</sup>、R<sup>7</sup> および R<sup>7</sup><sup>\*</sup> の各々は水素を意味する。

#### 【0082】

この発明のより好ましい具体例においては、オリゴマー中に組みこまれた LNA の R<sup>2</sup><sup>\*</sup> および R<sup>4</sup><sup>\*</sup> は一緒になって、ビラジカルを意味する。X は O であり、R<sup>2</sup> は水素、ヒドロキシおよび任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシから選択され、R<sup>1</sup><sup>\*</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>5</sup> および R<sup>5</sup><sup>\*</sup> は水素を意味するのが好ましく、より詳細には、ビラジカルは -O-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-N(R<sup>N</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>- および -(CH<sub>2</sub>)<sub>2-4</sub>- から選択され、特に -O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>- および -NR<sup>N</sup>-CH<sub>2</sub>- から選択される。通常、これまでに得られた結果に関しては、R<sup>2</sup><sup>\*</sup> および R<sup>4</sup><sup>\*</sup> を構成するビラジカルは、2つの炭素原子橋を形成する、すなわちビラジカルはフラノース環 (X=O) を有する5員環を形成するのが好ましい。

#### 【0083】

本発明の別の具体例において、オリゴマー中に組みこまれる LNA の R<sup>2</sup> および R<sup>3</sup> は一緒になってビラジカルを意味する。X は O であり、R<sup>2</sup><sup>\*</sup> は水素、ヒドロキシおよび任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシから選択され、R<sup>1</sup><sup>\*</sup>、R<sup>4</sup><sup>\*</sup>、R<sup>5</sup> および R<sup>5</sup><sup>\*</sup> は水素を意味するのが好ましく、さらに詳細にはビラジカルは -(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>0-1</sub>-N(R<sup>N</sup>)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-3</sub>- および -(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>- から選択され、特に -O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>-、-NR<sup>N</sup>-CH<sub>2</sub>- から選択される。後者の場合、アミノおよびチオ変形体が特に興味深いようである。

#### 【0084】

本発明のさらなる具体例において、オリゴマー中に組みこまれる LNA の R<sup>2</sup><sup>\*</sup> および R<sup>3</sup> は一緒になって、ビラジカルを意味する。X は O であり、R<sup>2</sup> は水

素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、 $R^1$ 、 $R^4$ 、 $R^5$  および  $R^5$ \* は水素を意味するのが好ましく、より詳細には、ビラジカルは  $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{2-4}-$  から選択される。

### 【0085】

この発明のさらなる具体例において、オリゴマー中に組みこまれた LNA の  $R^3$  および  $R^4$ \* は、一緒になってビラジカルを意味する。X は 0 であり、 $R^2$ \* は水素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$  および  $R^5$ \* は水素を意味するのが好ましく、より詳細にはビラジカルは  $-(CH_2)_{0-2}-O-(CH_2)_{0-2}-$  である。

### 【0086】

この発明のさらなる具体例において、オリゴマー中に組みこまれた LNA の  $R^3$  および  $R^5$ \* は、一緒になってビラジカルを意味する。X は 0 であり、 $R^2$ \* は水素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^4$  および  $R^5$ \* は水素を意味するのが好ましく、より詳細にはビラジカルは  $-O-(CHR^*)_{2-3}-$  および  $-(CHR^*)_{1-3}-O-(CHR^*)_{0-3}-$  から選択される。

### 【0087】

この発明のさらなる具体例において、オリゴマー中に組みこまれた LNA の  $R^1$ \* および  $R^4$ \* は一緒になってビラジカルを意味する。X は 0 であり、 $R^2$ \* は水素、ヒドロキシおよび任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシから選択され、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$  および  $R^5$ \* は水素を意味するのが好ましく、より詳細にはビラジカルは  $-(CH_2)_{0-2}-O-(CH_2)_{0-2}-$  である。

### 【0088】

これらの具体例において、オリゴマー中に組みこまれた LNA の少なくとも 1 つが、アデニンおよびグアニンから選択される核塩基(置換基 B)を含むのがさらに好ましい。特に、オリゴマーが、組みこまれた LNA を有し、そのうち両方がチミン、ウラシルおよびシトシンから選択された少なくとも 1 つの核塩基と、アデニンおよびグアニンから選択された少なくとも 1 つの核塩基を含有するのが好ましい。LNA モノマーには、核塩基がアデニンおよびグアニンから選択されるのが特に好ましい。

## 【0089】

これらの好ましい具体例には、LNA(類)が一般式 Ia(以下参照)を有するのも好ましい。

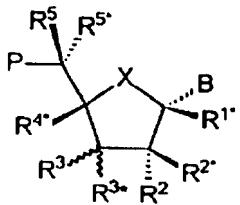
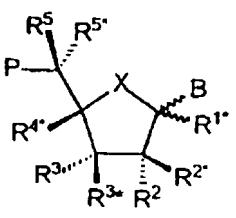
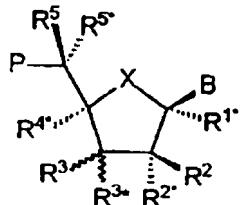
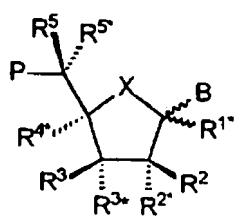
## 【0090】

オリゴスクレオチドの全モノマーが LNA モノマーであるのは、これらの興味深い具体例の变形内である。

## 【0091】

一般式 I(オリゴマー中の LNA(類))(および一般式 II(単量体の LNA) - 以下参照)およびそれと関連した定義から明らかのように、置換基や可能なビラジカルの性質によってオリゴマー(および単量体の LNA)中に 1 または幾つかの不斉炭素原子が存在しうる。以下参照。この発明の方法に従って製造されたオリゴマーおよびオリゴマー自体は、個々のモノマーフラグメントおよびそれらの混合物、ラセミ混合物も含むいずれの全アイソマーの存在により生じる全ての立体異性体を含むことを意図する。5- または 6-員環を考慮すると、しかしながら、一定の立体化学配置、例えば、以下

## 【化12】



## 【0092】

[式中、波線は該 2 つの置換基の入れ替わりから生じる両方のジアステレオマーの可能性を表す]

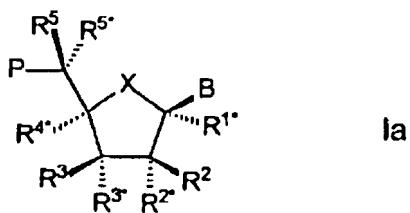
が特に興味深いと考えられる。

### 【0093】

特に興味深い立体異性体の表現は、LNA(類)が以下の式 Ia

### 【0094】

### 【化13】



### 【0095】

を有するものである。

### 【0096】

また、式 Ia の変形 [式中、B が「 $\alpha$ -配置」にある] が本発明の別の観点として興味深い。

### 【0097】

これらの場合、通常と同様に、R<sup>3</sup> は P' を意味するのが好ましい。

### 【0098】

本発明に従ったオリゴマーは、一般式 I(またはより詳細には一般式 Ia)のLNA(類)1~10000ならびに天然に存在するヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体から選択されるヌクレオシド0~10000から典型的になる。ヌクレオシドの数と LNA(類)の数の合計は、少なくとも 2 であり、好ましくは少なくとも 3 であり、特に少なくとも 5 であり、とりわけ少なくとも 7 であり、2~15000 の範囲であり、好ましくは 2~100、3~100 のような範囲であり、特に 2~50 の、3~50 または 5~50 または 7~50 のような範囲である。

### 【0099】

少なくとも一つの LNA は置換基 B のような核塩基からなるのが好ましい。

### 【0100】

本文中で、用語「ヌクレオシド」はヘテロ環式塩基のグリコシドを意味する。

用語「ヌクレオシド」は、天然には存在しないヌクレオシド、天然に存在するヌクレオシド、および他のヌクレオシド類似体を含むように広く使用される。ヌクレオシドの実例は、リポース部分からなるリボヌクレオシドおよびデオキシリボース部分からなるデオキシリボヌクレオシドである。そのようなヌクレオシドの塩基に関しては、これは、天然に存在する塩基、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルならびにそれらの修飾された変形、または可能な非天然塩基のいずれかであってもよいことが理解されるであろう。

### 【0101】

定義ならびに公知ヌクレオシド(天然に存在するものおよび天然には存在しないもの)およびヌクレオシド類似体(公知2-および3-環式類似体を含む)を考慮すると、オリゴマーが1以上のLNA(類)(それらは、置換基の選択に関してと、ビラジカルの選択に関しての両方が同一または異なっていてもよい)および1以上のヌクレオシドおよび/またはヌクレオシド類似体からなってもよいことが明らかである。本文中で「オリゴヌクレオチド」は、ヌクレオシド間結合により結合したヌクレオシドの連続鎖を意味し、しかし、オリゴマー(オリゴヌクレオチド)中の1以上のヌクレオチド単位(モノマー)中の核塩基は、上記のような置換基Bで修飾されていてもよいことが理解されるであろう。

### 【0102】

オリゴマーは、直鎖状、分岐状または環式であってもよい。分岐状オリゴマーの場合、分岐点は、ヌクレオシド中、ヌクレオシド間結合中、または興味をそそる具体例としてLNA中に位置してもよい。後者の場合、置換基R<sup>2</sup>、R<sup>2\*</sup>、R<sup>3</sup>およびR<sup>3\*</sup>は2つの基P<sup>\*</sup>を意味してもよく、それぞれは先行するモノマーへのヌクレオシド間結合を意味し、特に、R<sup>2</sup>およびR<sup>2\*</sup>の1つはP<sup>\*</sup>を意味し、R<sup>3</sup>およびR<sup>3\*</sup>の1つはさらにP<sup>\*\*</sup>を意味すると考えられている。

### 【0103】

上述のように、オリゴマーのLNA(類)は、ヌクレオシド間結合によって他のモノマーと結合する。本文中で、用語「ヌクレオシド間結合」は、-CH<sub>2</sub>-、-O-、-S-、-NR<sup>H</sup>-、>C=O、>C=NR<sup>H</sup>、>C=S、-Si(R'')<sub>2</sub>-、-SO-、-S(O)<sub>2</sub>-、-P(O)<sub>2</sub>-、-PO(BH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-、-P(O,S)-、-P(S)<sub>2</sub>-、-PO(R'')-、-PO(OCH<sub>3</sub>)-および-PO(NHR<sup>H</sup>)-[式中

、 $R''$  は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択され、 $R'''$  は  $C_{1-6}$ -アルキル および フェニルから選択される] から選択された、2 ~ 4、好ましくは 3 の基/原子からなる結合を意味する。そのようなヌクレオシド間結合の実例は、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CHOH}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH=}$  (継続するモノマーへの結合として使用されるとき、 $R^5$  を含む)、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{CO}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{CS}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{C}(=\text{NR}^H)-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{O}-\text{CO}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{CO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{CH=}-\text{N}-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}=$  (継続するモノマーへの結合として使用されるとき、 $R^5$  を含む)、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{CO}-\text{NR}^H-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{CO}-$ 、 $-\text{O}-\text{NR}^H-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH=}$  (継続するモノマーへの結合として使用されるとき、 $R^5$  を含む)、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SO}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{SO}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{S}-$ 、 $-\text{S}-\text{P}(\text{S})_2-\text{S}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}''')-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}-\text{R})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{BH}_3)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{NHR}^H)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{NR}^H)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{NR}^H)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}''')-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{CH}_3)-\text{O}-$  および  $-\text{O}-\text{Si}(\text{R}''')_2-\text{O}-$  であり; このうち、 $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NR}^H-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NR}^H-\text{O}-$ 、 $-\text{S}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{S})-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{S})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}^H-\text{P}(\text{O})_2-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{NR}^H)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{P}(\text{O}, \text{NR}^H)-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\text{PO}(\text{R}''')-\text{O}-$  が特に好ましい。さらに、実例としては Mesmaeker ら、Current Opinion in Structural Biology 1995, 5, 343~355 中に挙げられている。ヌクレオシド間結合の左手側は、置換基  $\text{P}'$  として 5- または 6- 員環に結合しており、一方、右手側は先行するモノマーの 5'- 位に結合している。

該 LNA が 5'-末端モノマーである場合、基 P も 5'-末端基を意味するのは上記からも明らかである。そのような 5'-末端基の例は、水素、ヒドロキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニルオキシ、任意に置換されたアリールオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェートおよび -W-A' [式中、W は -O-、-S- および -N(R<sup>H</sup>)- [ここで、R<sup>H</sup> は水素および C<sub>1-6</sub>-アルキルから選択される] から選択され、かつ式中 A' は DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド(ここで、後者の基は置換基 B 用に定義したようなスペーサーを含んでもよい)から選択される] である。

#### 【0105】

この明細書および特許請求の範囲において、用語「モノホスフェート」、「ジホスフェート」および「トリホスフェート」は、それぞれ式: -O-P(O)<sub>2</sub>-O-、-O-P(O)-O-P(O)<sub>2</sub>-O- および -O-P(O)<sub>2</sub>-O-P(O)<sub>2</sub>-O-P(O)<sub>2</sub>-O- の基を意味する。

#### 【0106】

特に興味深い具体例において、基 P はモノホスフェート、ジホスフェートおよびトリホスフェートから選択された 5'-末端基を意味する。特に、トリホスフェート変形体は基質として興味深い。

#### 【0107】

同様に、基 P\* は該 LNA が 3'-末端モノマーであるとき、3'-末端基を意味してもよい。そのような 3'-末端基の例は、水素、ヒドロキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニルオキシ、任意に置換されたアリールオキシおよび -W-A' [式中、W は -O-、-S- および -N(R<sup>H</sup>)- [ここで、R<sup>H</sup> は水素および C<sub>1-6</sub>-アルキルから選択される] から選択され、式中、A' は DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド(ここで後者の基は置換基 B 用に定義したようなスペーサーを含んでもよい)から選択される] である。

#### 【0108】

本発明の好ましい具体例において、オリゴマーは以下の式 V:

## 【0109】

$G-[Nu-L]_{n(0)}-[[LNA-L]_{m(q)}-[Nu-L]_{n(q)}]_q-G$  V

## 【0110】

[式中、

q は 1~50 であり；

$n(0)、..、n(q)$  の各々は独立して 0~10000 であり；

$m(1)、..、m(q)$  の各々は独立して 1~10000 である；

ただし、 $n(0)、..、n(q)$  および  $m(1)、..、m(q)$  の合計は 2~15000 である；

G は 5'-末端基を意味し；

各 Nu は天然に存在するヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体から選択された

ヌクレオシドを独立して意味し；

各 LNA はヌクレオシド類似体を独立して意味し；

各 L は Nu および LNA から選択された 2 つの基の間のヌクレオシド間結合を独

立して意味するか、または L は G と一緒にになって 3'-末端基を意味し；かつ

各 LNA-L は上記のような一般式 I、または好ましくは一般式 I a のヌクレオシ  
ド類似体を独立して意味する]

を有する。

## 【0111】

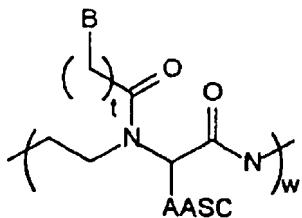
この具体例の中で、および通常、本発明は LNA を、異なる核塩基、特に、チ  
ミン、シトシンおよびウラシルから選択される核塩基と、アデニンおよびグアニ  
ンから選択される核塩基の両方と含めるという興味深い可能性を提供する。

## 【0112】

本発明の別の具体例において、オリゴマーは更に式

## 【0113】

## 【化14】



## 【0114】

[式中、B は式 I 用に上記で定義されたとおりであり、AASC は水素またはアミノ酸側鎖を意味し、t は 1~5 であり、w は 1~50 である]  
の PNA モノ- またはオリゴマーセグメントからなる。

## 【0115】

本文中で、用語「アミノ酸側鎖」は、 $\alpha$ -アミノ酸、すなわち、グリシン部分を除く該  $\alpha$ -アミノ酸に相当する、好ましくは天然に存在するかまたは用意に入手可能な  $\alpha$ -アミノ酸の  $\alpha$ -原子に結合した基を意味する。実例としては、水素(グリシン自体)、重水素(重水素化グリシン)、メチル(アラニン)、シアノメチル( $\beta$ -シアノ-アラニン)、エチル、1-プロピル(ノルバリン)、2-プロピル(バリン)、2-メチル-1-プロピル(ロイシン)、2-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロピル( $\beta$ -ヒドロキシ-ロイシン)、1-ブチル(ノルロイシン)、2-ブチル(イソロイシン)、メチルチオエチル(メチオニン)、ベンジル(フェニルアラニン)、p-アミノ-ベンジル(p-アミノ-フェニルアラニン)、p-ヨード-ベンジル(p-ヨード-フェニルアラニン)、p-フルオロ-ベンジル(p-フルオロ-フェニルアラニン)、p-ブロモ-ベンジル(p-ブロモ-フェニルアラニン)、p-クロロ-ベンジル(p-クロロ-フェニルアラニン)、p-ニトロ-ベンジル(p-ニトロ-フェニルアラニン)、 $\beta$ -(3-ピリジル)-アラニン)、3,5-ジヨード-4-ヒドロキシ-ベンジル(3,5-ジヨード-チロシン)、3,5-ジブロモ-4-ヒドロキシ-ベンジル(3,5-ジブロモ-チロシン)、3,5-ジクロロ-4-ヒドロキシ-ベンジル(3,5-ジクロロ-チロシン)、3,5-ジフルオロ-4-ヒドロキシ-ベンジル(3,5-ジフルオロ-チロシン)、4-メトキシ-ベンジル(0-メチル-チロシン)、2-ナフチルメチル( $\beta$ -(2-ナフチル)-アラニン)、1-ナフチルメチル( $\beta$ -(1-ナフチル)-アラニン)、3-インドリルメチル(トリプトファン)、ヒドロキシメチル(セリン)、1-ヒドロキシエチル(トレオニン)、メルカプトメチ

ル(システイン)、2-メルカプト-2-プロピル(ペニシラミン)、4-ヒドロキシベンジル(チロシン)、アミノカルボニルメチル(アスパラギン)、2-アミノカルボニルエチル(グルタミン)、カルボキシメチル(アスパラギン酸)、2-カルボキシエチル(グルタミン酸)、アミノメチル( $\alpha$ , $\beta$ -ジアミノプロピオン酸)、2-アミノエチル( $\alpha$ , $\gamma$ -ジアミノ酪酸)、3-アミノ-1-プロピル(オルニチン)、4-アミノ-1-ブチル(リジン)、3-グアニジノ-1-プロピル(アルギニン)および4-イミダゾリルメチル(ヒスチジン)である。

### 【0116】

PNAモノーまたはオリゴマーセグメントは、欧洲特許出願第EP 0672677 A2号に記載のようにオリゴマー中に組みこまれてもよい。

### 【0117】

本発明のオリゴマーはまた、キメラオリゴマーを包含することを意図する。「キメラオリゴマー」は、直接またはスペーサーを介して、異なる起源のモノマー類と結合した2以上のオリゴマー類を意味する。結合されてもよい、そのようなオリゴマーの実例は、ペプチド、PNA-オリゴマー類、オリゴマー含有LNA'sオリゴマー類およびオリゴヌクレオチドオリゴマー類である。

### 【0118】

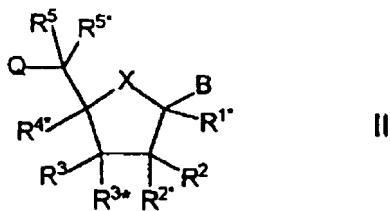
上記で定義したオリゴマーとは別に、本発明は、(例えば核酸ポリメラーゼ、ポリヌクレオチドキナーゼ、ターミナルトランスフェラーゼの)基質として、および治療剤として有用な(例えばオリゴマーの製造において)単量体のLNAを提供する。以下、参照。単量体のLNAは、全体の構造中(特に可能なビラジカルに関して)において、オリゴマー中の構成要素として定義されたLNAに相当し、しかし、基PおよびP'に関して、単量体のLNAは以下に説明するように、わずかに異なる。さらに、単量体のLNAは、特に単量体のLNAが化学合成によってオリゴマー中に組みこまれる場合には、官能基保護基からなってもよい。

### 【0119】

可能な単量体のLNAの興味深い部分群は、一般式II

### 【0120】

### 【化15】



## 【0121】

[式中、置換基 B は核塩基、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され；X は -O-、-S-、-N(R<sup>n</sup>)- および -C(R<sup>b</sup>R<sup>b</sup>)- から選択され、-O-、-S- および -N(R<sup>n</sup>)- が好ましく；置換基 R<sup>2</sup>、R<sup>2'</sup>、R<sup>3</sup> および R<sup>3'</sup> の一つは基 Q<sup>\*</sup> であり；

## 【0122】

Q および Q<sup>\*</sup> の各々は、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、Act-O-、メルカプト、Prot-S-、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、アミノ、Prot-N(R<sup>h</sup>)-、Act-N(R<sup>h</sup>)-、モノ-またはジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、アミノメチル、Prot-N(R<sup>h</sup>)-CH<sub>2</sub>-、Act-N(R<sup>h</sup>)-CH<sub>2</sub>-、カルボキシメチル、スルホノメチル[ここで、Prot はそれぞれ -OH、-SH および -NH(R<sup>h</sup>) の保護基であり、Act はそれぞれ -OH、-SH および -NH(R<sup>h</sup>) の活性基であり、R<sup>h</sup> は水素および C<sub>1-6</sub>-アルキルから選択される] から独立して選択され；

## 【0123】

R<sup>2</sup> および R<sup>4</sup> は、-O-、-S-、-N(R<sup>n</sup>)-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s+1</sub>-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-N(R<sup>n</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-、-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>n</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>n</sup>)-、-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>n</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>n</sup>)-、-N(R<sup>n</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-

$S-$  および  $-S-(CR^* R^*)_{r+s}-N(R^*)-$  から選択されるビラジカルを一緒になって意味し；  $R^2$  および  $R^3$  は  $-O-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるビラジカルを一緒になって意味し；  $R^{2*}$  および  $R^3$  は  $-O-$ 、 $-(CR^* R^*)_{r+s}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_{s*}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_{s*}-$  から選択されるビラジカルを一緒になって意味し；  $R^3$  および  $R^{4*}$  は  $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_{s*}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_{s*}-$  から選択されるビラジカルを一緒になって意味し；  $R^3$  および  $R^5$  は  $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるビラジカルを一緒になって意味し；  $R^{1*}$  および  $R^{4*}$  は  $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_s-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_s-$  から選択されるビラジカルを一緒になって意味し； または  $R^{1*}$  および  $R^{2*}$  は、 $-(CR^* R^*)_r-O-(CR^* R^*)_{s*}-$ 、 $-(CR^* R^*)_r-S-(CR^* R^*)_s-$  および  $-(CR^* R^*)_r-N(R^*)-(CR^* R^*)_{s*}-$  から選択されるビラジカルを一緒になって意味する； [ここで、 $R^*$  はオリゴマー用に上記で定義されたとおりであり； 置換基  $R^{1*}$ 、 $R^2$ 、 $R^{2*}$ 、 $R^3$ 、 $R^{4*}$ 、 $R^5$  および  $R^{5*}$  の各々は、それらは  $Q$ 、 $Q'$  またはビラジカルに含まれず、オリゴマー用に上記で定義されたとおりである] ]

の 2環式ヌクレオシド類似体 (LNA) からなる。

#### 【0124】

公知の 2環式ヌクレオシド類似体を充分に考慮すると、 $R^2$  および  $R^3$  は一緒になって  $-O-CH_2-CH_2-$  および  $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$  から選択されるビラジカルを意味せず；  $R^3$  および  $R^5$  は一緒になって  $-CH_2-CH_2-$ 、 $-O-CH_2-$  および  $-O-Si(^1Pr)_2-$ 、 $-O-Si(^1Pr)_2-O-$  から選択されるビラジカルを意味しないことは、さらに理解できるであろう。

#### 【0125】

単量体の LNA もまた、それらの塩基性塩および酸付加塩からなる。さらに、化学的なオリゴヌクレオチド合成において普及している条件下で反応性などのような化学基(どのような核塩基も含む)は、当該分野で公知なように任意に官能基保護されることは理解されるであろう。これは、単量体の LNA のヒドロキシ、ア

ミノ、カルボキシ、スルホノおよびメルカプト基、ならびに核塩基のような基が任意に官能基保護されていることを意味する。保護(および脱保護)は当該分野の当業者に公知の方法により行われる(参照、例えば Greene, T. W. および Wuts, P. G. M., "Protective Groups in Organic Synthesis", 2nd ed., John Wiley, N.Y. (1991), および M.J. Gait, Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, 1984)。

### 【0126】

ヒドロキシ保護基の実例は、4,4'-ジメトキシトリチル(DMT)、4-モノメトキシトリチル(MMT)およびトリチルのような任意に置換されたトリチル、任意に置換された9-(9-フェニル)キサンテニル(pixyl)、任意に置換されたエトキシカルボニルオキシ、p-フェニルアゾフェニルオキシカルボニルオキシ、テトラヒドロピラニル(thp)、9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)、メトキシテトラヒドロピラニル(mthp)、トリメチルシリル(TMS)、トリイソプロピルシリル(TIPS)、tert-ブチルジメチルシリル(TBDMS)、トリエチルシリルおよびフェニルジメチルシリルのようなシリルオキシ、2-プロモベンジルオキシカルボニルのようなベンジルオキシカルボニルまたは置換されたベンジルオキシカルボニルエーテル、tert-ブチルエーテル、メチルエーテルのようなアルキルエーテル、アセタール(2つのヒドロキシ基を含む)、アセチルまたはハロゲン置換されたアセチルのようなアシルオキシ(例えば、クロロアセチルまたはフルオロアセチル)、イソブチリル、ピバロイル、ベンゾイルおよび置換されたベンゾイル、メトキシメチル(MOM)、2,6-ジクロロベンジル(2,6-Cl<sub>2</sub>Bz)のようなベンジルエーテルまたは置換されたベンジルエーテルである。代わりとして、ヒドロキシ基は任意にリンカーによって、固体支持体への付着により保護されてもよい。

### 【0127】

アミノ保護基の実例は、Fmoc(フルオレニルメトキシカルボニル)、BOC(tert-ブチルオキシカルボニル)、トリフルオロアセチル、アリルオキシカルボニル(aloc, AOC)、ベンジルオキシカルボニル(Z, Cbz)、2-クロロベンジルオキシカルボニル((2-ClZ)のような置換されたベンジルオキシカルボニル、モノメトキシトリチル(MMT)、ジメトキシトリチル(DMT)、フタロイルおよび9-(9-フェニル)

キサンテニル(pixyl)である。

### 【0128】

カルボキシ保護基の実例は、アリルエステル、メチルエステル、エチルエステル、2-シアノエチルエステル、トリメチルシリルエチルエステル、ベンジルエステル(Obz1)、2-アダマンチルエステル(0-2-Ada)、シクロヘキシリルエステル(0cHex)、1,3-オキサゾリン、オキサゾーラ(oxazoler)、1,3-オキサゾリジン、アミドまたはヒドラジンである。

### 【0129】

メルカプト保護基の実例は、トリチル(Trt)、アセタミドメチル(acm)、トリメチルアセタミドメチル(Tacm)、2,4,6-トリメトキシベンジル(Tmob)、tert-ブチルスルフェニル(StBu)、9-フルオレニルメチル(Fm)、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル(Npys)および4-メチルベンジル(Meb)である。

### 【0130】

さらに、単量体のLNA中に含まれる核塩基のいずれも、特に、単量体のLNAが本発明のオリゴマー中に組みこまれるときには、保護するのが必要または望ましいであろう。本文中で、用語「保護された核塩基」は、該核塩基が当該分野の当業者に公知の基から選択される保護基を有することを意味する(例えば、Protocols for Oligonucleotides and Analogs, vol 20, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, NJ; S. L. BeaucageおよびR. P. Iyer, Tetrahedron, 1993, 49, 6123; S. L. BeaucageおよびR. P. Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223; ならびにE. UhlmannおよびA. Peyman, Chem. Rev., 90, 543.を参照)。実例としては、ベンゾイル、イソブチリル、tert-ブチル、tert-ブチルオキシカルボニル、4-クロロ-ベンジルオキシカルボニル、9-フルオレニルメチル、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル、4-メトキシベンゾイル、4-メトキシトリフェニルメチル、任意に置換されたトリアゾール、p-トルエンスルホニル、任意に置換されたスルホニル、イソプロピル、任意に置換されたアミジン、任意に置換されたトリチル、フェノキシアセチル、任意に置換されたアシル、pixyl、テトラヒドロピラニル、任意に置換されたシリルエーテルおよび4-メトキシベンジルオキシカルボニルである。「Protocols for oligonucleotide conjug

ates」, Methods in Molecular Biology, vol 26, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, NJ. の第1章ならびに S. L. Beaucage および R. P. Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223 には更なる適当な例が開示されている。

### 【0131】

好ましい具体例において、単量体の LNA 中の基 B は、核塩基および保護された核塩基から選択されるのが好ましい。

### 【0132】

この発明の単量体の LNA の具体例において、Q および Q' の1つ、好ましくは Q' は、Act-O-、Act-S-、Act-N(R<sup>H</sup>)-、Act-O-CH<sub>2</sub>-、Act-S-CH<sub>2</sub>-、Act-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>- から選択される基を意味し、Q および Q' の他方、好ましくは Q は、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、メルカプト、Prot-S-、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、アミノ、Prot-N(R<sup>H</sup>)-、モノ-またはジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、アミノメチル、Prot-N(R<sup>H</sup>)-CH<sub>2</sub>-、カルボキシメチル、スルホノメチル [R<sup>H</sup> は水素および C<sub>1-6</sub>-アルキルから選択される] から選択される基を意味する。

### 【0133】

上記の場合、基 Prot はそれぞれ -OH、-SH および -NH(R<sup>H</sup>) の保護基を意味する。そのような保護基は、しかし、安定で可逆的な保護基の必要性を考慮にいれながら、ヒドロキシ保護基、メルカプト保護基およびアミノ保護基用に上記で定義されたのと同じものからそれぞれ選択される。しかし、-OH 用のどのような保護基も、ジメトキシトリチル (DMT)、モノメトキシトリチル (MMT) およびトリチルのような任意に置換されたトリチル、ならびに 9-(9-フェニル)キサンテニル (pixyl)、任意に置換された、テトラヒドロピラニル (thp) (ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチド合成のための更に適当なヒドロキシ保護基は、Agrawal, ed.

"Protocols for Oligonucleotide Conjugates"; Methods in Molecular Biology, vol. 26, Humana Press, Totowa, NJ (1994) および Protocols for Oligonucleotides and Analogs, vol 20, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, NJ に記載されている) から選択されるかまたはアセタールとして保護され; -SH 用のどのような保護基もジメトキシトリチル (DMT)、モノメトキシトリチル (MMT) およびトリチルのようなトリチル、ならびに 9-(9-フェニル)キサンテニル (pixyl)、任意に置換された、テトラヒドロピラニル (thp) (ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチド合成のための更に適当なメルカプト保護基もまた、Agrawal (上記参照) に記載されている) から選択され; かつ -NH(R<sup>n</sup>) 用のどのような保護基もジメトキシトリチル (DMT)、モノメトキシトリチル (MMT) およびトリチルのようなトリチル、ならびに 9-(9-フェニル)キサンテニル (pixyl)、任意に置換された、テトラヒドロピラニル (thp) (ホスホルアミダイトオリゴヌクレオチド合成のための更に適当なアミノ保護基もまた、Agrawal (上記参照) に記載されている) から選択されることが好ましい。

#### 【0134】

上記具体例において、ここで定義したいずれの単量体の LNA の具体例と同様、Act はそれぞれ -OH、-SH および -NH(R<sup>n</sup>) の活性基を意味する。そのような活性基は、例えば任意に置換された O-ホスホルアミダイト、任意に置換された O-ホスホトリエステル (phosphortriester)、任意に置換された O-ホスホジエステル (phosphordiester)、任意に置換された H-ホスホネートおよび任意に置換された O-ホスホネート から選択される。

#### 【0135】

本文中で、用語「ホスホルアミダイト」は、式  $-P(OR^x)-N(R^y)_2$  [式中、R<sup>x</sup> は 任意に置換されたアルキル基、例えばメチル、2-シアノエチルまたはベンジルを意味し、R<sup>y</sup> の各々は任意に置換されたアルキル基、例えばエチルもしくはイソプロピルを意味するかまたは基  $-N(R^y)_2$  はモルホリノ基 ( $-N(CH_2CH_2)_2O$ ) を形成する] の基を意味する。R<sup>x</sup> は 2-シアノエチルを意味するのが好ましく、2つの R<sup>y</sup> は同一でイソプロピルを意味するのが好ましい。従って、特に適切なホスホルアミダイトは、N,N-ジイソプロピル-O-(2-シアノエチル)ホスホルア

ミダイトである。

### 【0136】

ただ一つの単量体の LNA または幾つかの単量体の LNA 用にここで使用される保護基は、この/これらの LNA(類)が本発明のオリゴマー中に組みこまれるときに、官能基の同時に起こる脱保護または連続して起こる脱保護を行うことができるよう、選択されてもよいことが理解されるであろう。後者の状況は、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドのような 1 または幾つかの「活性な／官能」基を位置選択的に導入する可能性を残している [ここで、そのような基は上記したスペーサーにより結合してもよい]。

### 【0137】

好ましい具体例において、Q は水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、メルカプト、Prot-S-、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、アミノ、Prot-N(R<sup>h</sup>)-、モノ-またはジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot-O-CH<sub>2</sub>-、アミノメチル、Prot-N(R<sup>h</sup>)-CH<sub>2</sub>-、カルボキシメチル、スルホノメチル [式中、Prot はそれぞれ -OH、-SH および -NH(R<sup>h</sup>) の保護基であり、R<sup>h</sup> は水素および C<sub>1-6</sub>-アルキルから選択される] から選択され； Q' は水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Act-O-、メルカプト、Act-S-、C<sub>1-6</sub>-アルキルチオ、アミノ、Act-N(R<sup>h</sup>)-、モノ-またはジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルキニルオキシ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ [式中

、Act はそれぞれ  $-OH$ 、 $-SH$  および  $-NH(R^H)$  の活性基であり、 $R^H$  は水素および  $C_{1-6}$ -アルキルから選択される] から選択される。

### 【0138】

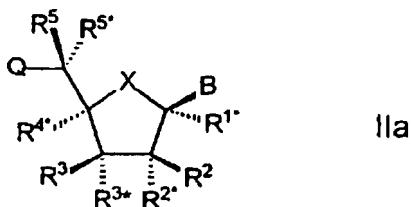
一般式 II の单量体の LNA は、オリゴマーに組みこまれる LNA として、様々な立体異性体を表してもよい。従って、オリゴマーに組みこまれた LNA 用に上記で記載した立体化学異性体は、单量体の LNA の場合に等しく適用可能と考えられる(しかし、P はそのとき Q と置きかえられることに注目されたし)。

### 【0139】

本発明の好ましい具体例において、单量体の LNA は 一般式 IIa

### 【0140】

### 【化16】



### 【0141】

[式中、置換基は上記のとおりである]  
を有する。

### 【0142】

さらに、置換基、ビラジカル、R 等の定義に関しては、本発明に従ったオリゴマー用に上記で定義したのと同じ好ましい具体例が、また单量体の LNA の場合にも適用される。

### 【0143】

この発明の单量体の LNA の特に興味深い具体例において、B は核塩基、好ましくはチミン、シトシン、ウラシル、アデニンおよびグアニン(特にアデニンおよびグアニン)から選択される核塩基を意味し、X は  $-O-$  であり、 $R^2'$  および  $R^4'$  は、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{0-1}-N(R^H)-(CH_2)_{1-3}-$ 、特に  $-O-CH_2-$ 、 $-S-CH_2-$  および  $-R^H-CH_2-$  [ここで  $R^H$  は水素お

よび  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から選択されるビラジカルを一緒になって意味し、Q は Prot-O- を意味し、 $R^3$  は Act-OH を意味する  $Q'$  であり、 $R^1$ 、R<sup>2</sup>、 $R^3$ 、 $R^5$  および  $R^5'$  はそれぞれ水素を意味する。この具体例において、 $R^N$  もまた DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択されてもよい。

#### 【0144】

本発明の単量体の LNA の更に特に興味深い具体例において、B は、核塩基、好ましくはチミン、シトシン、ウラシル、アデニンおよびグアニン(特にアデニンおよびグアニン)から選択される核塩基を意味し、X は -O- であり、 $R^2$  および  $R^4$  は一緒になって、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{0-1}-N(R^N)-(CH_2)_{1-3}-$ 、特に -O-CH<sub>2</sub>-、-S-CH<sub>2</sub>- および -R<sup>N</sup>-CH<sub>2</sub>- [ここで、 $R^N$  は水素および  $C_{1-4}$ -アルキルから選択される] から選択されるビラジカルを意味し、Q は、ヒドロキシ、メルカプト、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェートおよびトリホスフェートから選択され、 $R^3$  は水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルおよび任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルオキシから選択される Q' であり、 $R^3$  は水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルおよび任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニルから選択され、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  および  $R^5$  はそれぞれ水素を意味する。ここでまた、 $R^N$  もまた DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択されてもよい。

#### 【0145】

本発明の単量体の LNA のさらに特に興味深い具体例において、B は核塩基を意味し、X は -O- であり、 $R^2$  および  $R^3$  は一緒になって、 $-(CH_2)_{0-1}-O-CH=CH-$

、 $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{S}-\text{CH}=\text{CH}-$  および  $-(\text{CH}_2)_{0-1}-\text{N}(\text{R}^{\text{N}})-\text{CH}=\text{CH}-$  [ここで  $\text{R}^{\text{N}}$  は水素および  $\text{C}_{1-4}$ -アルキルから選択される] から選択されるピラジカルを意味し、Q はヒドロキシ、メルカプト、 $\text{C}_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $\text{C}_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $\text{C}_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $\text{C}_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $\text{C}_{2-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェートおよびトリホスフェートから選択され、 $\text{R}^3$  は水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、 $\text{C}_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、モノ-またはジ( $\text{C}_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $\text{C}_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $\text{C}_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $\text{C}_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $\text{C}_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $\text{C}_{2-6}$ -アルキニルおよび任意に置換された  $\text{C}_{2-6}$ -アルキニルオキシから選択された Q であり、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$  および  $\text{R}^6$  はそれぞれ水素を意味する。

### 【0146】

本発明の一つの観点は、固相および/または溶液相のオリゴマー中の組み込み用 LNA の様々な誘導体を提供することである。実例として、ホスホルアミダイトアプローチ、ホスホトリエステル アプローチおよび H-ホスホネートアプローチをそれぞれ使用する、(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン、(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(ウラシル-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン、(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(グアニン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタンおよび (1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(アデニン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタンの組み込みに適したモノマーは、(1R,3R,4R,7S)-7-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン、(1R,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-7-O-(2-クロロフェニルホスフェート)ならびに (1R,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-7-O-(2-クロロフェニルホスフェート)。

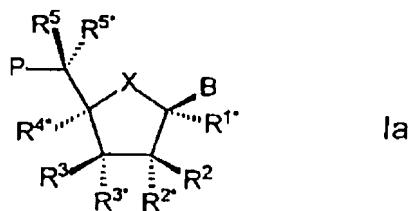
'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン-7-O-(H-ホスホネット) およびそれぞれその 3-(シトシン-1-イル)、3-(ウラシル-1-イル)、3-(アデニン-1-イル) および 3-(グアニン-1-イル)類似体である。さらに、モノマーのメチレンオキシビラジカルがメチレンチオ、メチレンアミノまたは1,2-エチレンビラジカルで置換された類似体は、また本発明の特に興味深い変形体を構成すると期待される。メチレンチオおよびメチレンアミノ類似体は、メチレンオキシ類似体として等しく適用可能であると考えられ、その結果、(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン、(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(シトシン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン、(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(ウラシル-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン、(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(グアニン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタンおよび(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(アデニン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタンの組み込み用に記載されたものに相当する特定の試薬はまた、本発明内特に興味深い反応性モノマーとして、考えられる。メチレンアミン類似体としては、第2級アミンは、メチルおよびベンジルのような任意に置換されたC<sub>1-6</sub>-アルキル、トリフルオロアセチルのような任意に置換されたC<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニル、任意に置換されたアリールカルボニルならびに任意に置換されたヘテロアリールカルボニルから選択された置換基を有してもよいことに注目されたい。

## 【0147】

特に興味深い具体例において、本発明は、一般式 Ia

## 【0148】

## 【化17】



## 【0149】

[式中、X は -O- であり；B は核塩基、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され；P は、継続するモノマーへのヌクレオシド間結合のためのラジカル位、または5'-末端基を意味し、そのようなヌクレオシド間結合または5'-末端基は任意に置換基 R<sup>s</sup> を含む；R<sup>3'</sup> は、先行するモノマーへのヌクレオシド間結合、または3'-末端基を意味する基 P<sup>r</sup> であり；R<sup>2'</sup> および R<sup>4'</sup> は一緒になって -O-、-S-、-N(R<sup>r</sup>)-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s+1</sub>-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-、-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r</sub>-N(R<sup>r</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>s</sub>-、-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>r</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>r</sup>)-、-S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S-、-N(R<sup>r</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>r</sup>)-、-N(R<sup>r</sup>)-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-S- および -S-(CR<sup>r</sup>R<sup>s</sup>)<sub>r+s</sub>-N(R<sup>r</sup>)- から選択されるビラジカルを意味し；式中、各 R<sup>r</sup> は水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ-またはジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、かつ/または2つの隣接した(非ジェミナルな) R<sup>r</sup> は一緒になって二重結合を意味してもよく、かつ r および s の各々は 0~3 であり、ただし r+s の合計は 1~4 であり；各置換基 R<sup>1'</sup>、R<sup>2'</sup>、R<sup>3'</sup>、R<sup>5'</sup> および R<sup>s</sup> は、水素、任意に置換された C<sub>1-6</sub>-アルキル、任意に置換された C<sub>2-6</sub>-アルケニル、ヒドロキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシ、C<sub>2-6</sub>-アルケニルオキシ、カルボキシ、C<sub>1-6</sub>-アルコキシカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ(C<sub>1-6</sub>-アルキル)-アミノカルボニル、C<sub>1-6</sub>-アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アジド、C<sub>1-6</sub>-アルカノイルオ

キシ、スルホノ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンド、ならびにハロゲン [ここで、2つのジェミナル置換基は一緒になって、オキソを意味してもよい] から独立に選択される]

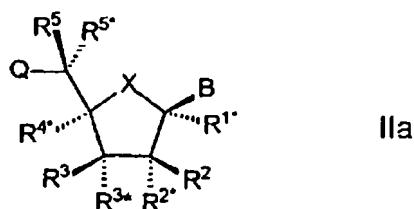
の LNA ならびにその塩基性塩および酸付加塩の少なくとも1つからなるオリゴマーに関する。特に、一つの  $R^*$  は、水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、残りの置換基  $R^*$  は、水素である。特に、ピラジカルは  $-O-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-N(R^*)-(CH_2)_{1-3}-$ 、および  $-(CH_2)_{2-4}-$  から選択される。

### 【0150】

さらに興味深い具体例において、本発明は、一般式 IIa

### 【0151】

### 【化18】



### 【0152】

[式中、X は  $-O-$  であり；B は核塩基、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され； $R^*$  は基 Q\* であり；Q および Q\* の各々は、水素、アジド、ハロゲン、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、Prot-O-、Act-O-、メルカプト、Prot-S-、Act-S-、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、アミノ、Prot-N( $R^*$ )-、Act-N( $R^*$ )-、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルキニル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -

$C_{1-6}$ -アルキニルオキシ、モノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェート、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、リガンド、カルボキシ、スルホノ、ヒドロキシメチル、Prot- $O-CH_2-$ 、Act- $O-CH_2-$ 、アミノメチル、Prot- $N(R^H)-CH_2-$ 、Act- $N(R^H)-CH_2-$ 、カルボキシメチル、スルホノメチル [ここで、Prot はそれぞれ-OH、-SH および -NH( $R^H$ ) の保護基であり、Act はそれぞれ -OH、-SH および -NH( $R^H$ ) の保護基であり、 $R^H$  は水素 および  $C_{1-6}$ -アルキルである] から独立に選択され； $R^{2+}$  および  $R^{4+}$  は一緒になって、-O-、-S-、-N( $R^*$ )-、-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s+1</sub>-、-(CR\* $R^*$ )<sub>r</sub>-O-(CR\* $R^*$ )<sub>s</sub>-、-(CR\* $R^*$ )<sub>r</sub>-S-(CR\* $R^*$ )<sub>s</sub>-、-(CR\* $R^*$ )<sub>r</sub>-N( $R^*$ )-(CR\* $R^*$ )<sub>s</sub>-、-O-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-O-、-S-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-S-、-N( $R^*$ )-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-O-、-O-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-N( $R^*$ )-、-S-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-S-、-N( $R^*$ )-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-N( $R^*$ )-、-N( $R^*$ )-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-S- および -S-(CR\* $R^*$ )<sub>r+s</sub>-N( $R^*$ )- から選択されるビラジカルを意味し；ここで各  $R^*$  は、水素、ハロゲン、アジド、シアノ、ニトロ、ヒドロキシ、メルカプト、アミノ、モノ-またはジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから独立して選択され、および/または2つの隣接した(非ジェミナルな)  $R^*$  は一緒になって、二重結合を意味してもよく、かつ「 $r$  および  $s$  の各々は、0~3 であり、ただし  $r+s$  の合計は 1~4 である；各置換基  $R^1+$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^5$  および  $R^{5+}$  は、水素、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、カルバミド、アジド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基、およびリガンド、ならびにハロゲン [ここで、2つのジェミナル置換基は一緒になってオキソを意味してもよい] から独立して選択され；] の LNA ならびにその塩基性塩および酸付加塩 [ただし、オリゴヌクレオチド合

成において普及している条件下で反応性な、いずれの化学基(いずれの核塩基も含む)も任意に官能基は保護される]に関する。好ましくは、一つの  $R^*$  が水素、ヒドロキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルコキシ、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、DNA インターカレーター、光化学的に活性な基、熱化学的に活性な基、キレート基、リポーター基およびリガンドから選択され、残りのいずれの置換基  $R^*$  も水素である。特に、ピラジカルは  $-O-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-O-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-S-(CH_2)_{1-3}-$ 、 $-(CH_2)_{0-1}-N(R^n)-(CH_2)_{1-3}-$  および  $-(CH_2)_{2-4}-$  から選択される。

#### 【0153】

通常、本発明は、親和性および特異性に関して良好なハイブリッド化特性を驚いたことに有するオリゴマーを提供する。従って、本発明は、ヌクレオシド類似体を全く含まない相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドのよりも、少なくとも  $2.5\text{ }^\circ\text{C}$  高い、好ましくは少なくとも  $3.5\text{ }^\circ\text{C}$  高い、特に少なくとも  $4.0\text{ }^\circ\text{C}$  高い、ことのほか少なくとも  $5.0\text{ }^\circ\text{C}$  高い、オリゴマーに、相補的な DNA オリゴヌクレオチドとの  $T_m$  を与える少なくとも一つのヌクレオシド類似体からなるオリゴマーを提供する。特にオリゴマーの  $T_m$  は少なくとも  $2.5 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高く、好ましくは少なくとも  $3.5 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高く、特に少なくとも  $4.0 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高く、ことのほか少なくとも  $5.0 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高い [ $N$  はヌクレオシド類似体の数である]。

#### 【0154】

相補的な RNA オリゴヌクレオチドとのハイブリッド化の場合、少なくとも一つのヌクレオシド類似体は、ヌクレオシド類似体を全く含まない相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドのよりも、少なくとも  $4.0\text{ }^\circ\text{C}$  高い、好ましくは少なくとも  $5.0\text{ }^\circ\text{C}$  高い、特に少なくとも  $6.0\text{ }^\circ\text{C}$  高い、ことのほか少なくとも  $7.0\text{ }^\circ\text{C}$  高い、オリゴマーに、相補的な DNA オリゴヌクレオチドとの  $T_m$  を与える。特に、オリゴマーの  $T_m$  は少なくとも  $4.0 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高く、好ましくは少なくとも  $5.0 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高く、特に少なくとも  $6.0 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高く、ことのほか少なくとも  $7.0 \times N\text{ }^\circ\text{C}$  高い [ $N$  はヌクレオシド類似体の数である]。

#### 【0155】

用語「相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチド」は、完全に同じ順序(そし

て同じ配向)の同じ核塩基を表す天然に存在するヌクレオチドのみからなるオリゴヌクレオチドを意味することを意図している。

#### 【0156】

$T_m$  は以下の条件(すなわち実施例129に説明したものと本質的に同じに):

- a) 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、pH 7.0、100 mM NaCl、0.1 mM EDTA;
- b) 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  pH 7.0、0.1 mM EDTA; または
- c) 3M テトラメチルアンモニウムクロライド (TMAC)、10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、pH 7.0、0.1 mM EDTA;

の一つの下、

好ましくは条件 a) の下、オリゴマーおよび相補的な DNA オリゴヌクレオチドの等量(典型的には 1.0  $\mu\text{M}$ )で測定する。

#### 【0157】

少なくとも一つのヌクレオシド類似体が式 I [式中、B は核塩基である] を有するオリゴマーは、上記で定義したとおりが好ましい。特に興味深いのは、少なくとも一つのヌクレオシド類似体がアデニンおよびグアニンから選択される核塩基を含む場合である。

#### 【0158】

さらに、特異性および親和性に関して、部分的に相補的な DNA オリゴヌクレオチドまたは部分的に相補的な RNA オリゴヌクレオチドとハイブリッド化するとき、該オリゴマーと 1 以上のミスマッチを有するオリゴマーは、該ミスマッチの結果、ヌクレオシド類似体を全く含まない、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドでみられる減少と同じかまたはより大きい減少を  $T_m$  において生じるであろう。また、オリゴマーは、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドのと実質的に同じ、ハイブリッド化緩衝液のイオン強度に対する  $T_m$  の感度を有するであろう。

#### 【0159】

ここで定義されたオリゴマーは、典型的に少なくとも 30 % 修飾され、好ましくは少なくとも 50 % 修飾され、特に 70 % 修飾され、およびある興味深い適用においては 100 % 修飾される。

## 【0160】

本発明のオリゴマーは、相当する非修飾な参照オリゴヌクレオチドよりも実質的により高い 3'-エキソヌクレオリティック (exonucleolytic) 安定性を有している。この重要な物性は実施例 136 において記載されているように試験される。

## 【0161】

## (定義)

本文中で、用語「 $C_{1-12}$ -アルキル」は、メチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、シクロプロピル、ブチル、tert-ブチル、イソ-ブチル、シクロブチル、ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシル、およびドデシルのような 1 ~ 12 の炭素原子を有する直鎖状、環状または分岐状炭化水素基を意味する。類似して、用語「 $C_{1-6}$ -アルキル」は、メチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシルのような 1 ~ 6 の炭素原子を有する直鎖状、環状または分岐状炭化水素基を意味し、用語「 $C_{1-4}$ -アルキル」は、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、シクロプロピル、ブチル、イソ-ブチル、tert-ブチル、シクロブチルのような 1 ~ 4 の炭素原子を有する直鎖状、環状または分岐状炭化水素基を含めることを意図する。

## 【0162】

「 $C_{1-6}$ -アルキル」の好ましい例はメチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、ブチル、tert-ブチル、イソ-ブチル、ペンチル、シクロペンチル、ヘキシル、シクロヘキシル、特にメチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、tert-ブチル、イソ-ブチルおよびシクロヘキシルである。「 $C_{1-4}$ -アルキル」の好ましい例は、メチル、エチル、プロピル、イソ-プロピル、ブチル、tert-ブチルおよびイソ-ブチルである。

## 【0163】

同様に、用語「 $C_{2-12}$ -アルケニル」も 2 ~ 12 の炭素原子を有し、1 つの不飽和結合からなる直鎖状、環状または分岐状炭化水素基を含む。アルケニル基の例としては、ビニル、アリル、ブテニル、ペンテニル、ヘキセニル、ヘプテニル、

オクテニル、ドデカエニルである。類似して、用語「 $C_{2-6}$ -アルケニル」は、2～6の炭素原子を有し、1つの不飽和結合からなる直鎖状、環状または分岐状炭化水素基を含むことを意図する。アルケニルの好ましい例は、ビニル、アリル、ブチニルであり、特にアリルである。

#### 【0164】

同様に、用語「 $C_{2-12}$ -アルキニル」は、2～12の炭素原子を有し、1つの三重結合を有する直鎖状または分岐状炭化水素基を意味する。その例は、エチニル、プロピニル、ブチニル、オクチニルおよびドデカニルである。

#### 【0165】

本文中で、すなわち用語「アルキル」、「アルケニル」および「アルキニル」に関して、用語「任意に置換された」は、該基が、ヒドロキシ(不飽和炭素原子に結合しているとき、互変異性ケト体で存在してもよい)、 $C_{1-6}$ -アルコキシ(すなわち、 $C_{1-6}$ -アルキル-オキシ)、 $C_{2-6}$ -アルケニルオキシ、カルボキシ、オキソ(ケトまたはアルデヒド官能性を形成する)、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカルボニル、アリールオキシ、アリールカルボニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールオキシカルボニル、ヘテロアリールオキシ、ヘテロアリールカルボニル、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ；カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノカルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、シアノ、グアニジノ、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、 $C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、スルファニル、 $C_{1-6}$ -アルキルチオ、ハロゲン〔ここで、いずれのアリールおよびヘテロアリールも、「任意に置換されたアリールおよびヘテロアリール」用に以下で特に記載されたように置換されてもよい〕から選択される基で1または何回か、好ましくは1～3回、置換されていてもよいことを意味する。

#### 【0166】

置換基は、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシカル

ボニル、アリールカルボニル、ヘテロアリール、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ、カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノカルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、シアノ、カルバミド、ハロゲン〔ここで、アリールおよびヘテロアリールは、 $C_{1-4}$ -アルキル、 $C_{1-4}$ -アルコキシ、ニトロ、シアノ、アミノまたはハロゲンで、1~5回、好ましくは1~3回、置換されていてもよい〕から選択されるのが好ましい。特に好ましい例は、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、カルボキシ、アリール、ヘテロアリール、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノおよびハロゲン〔ここで、アリールおよびヘテロアリールは、 $C_{1-4}$ -アルキル、 $C_{1-4}$ -アルコキシ、ニトロ、シアノ、アミノまたはハロゲンで1~3回置換されていてもよい〕である。

### 【0167】

本文中で用語「アリール」は、フェニル、ナフチル、1,2,3,4-テトラヒドロナフチル、アントラシル、フェナントラシル、ピレニル、ベンゾピレニル、フルオレニルおよびキサンテニルのような完全にまたは部分的に芳香族炭素環式環または環系を意味し、そのうちフェニルが好ましい例である。

### 【0168】

用語「ヘテロアリール」は、1以上の炭素原子がヘテロ原子、例えば窒素(=N-または-NH)、硫黄および/または酸素原子で置き換えられている、完全にまたは部分的に芳香族炭素環式環または環系を意味する。そのようなヘテロアリール基の例は、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピリダジニル、ピペリジニル、クマリル、フリル、キノリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾトリアゾリル、ベンゾジアゾリル、ベンゾオキソゾリル、フタラジニル、フタラニル、トリアゾリル、テトラゾリル、イソキノリル、アクリジニル、カルバゾリル、ジベンゾアゼピニル、インドリル、ベンゾピラゾリル、フェノキサゾニルである。

### 【0169】

本文中で、すなわち、用語「アリール」および「ヘテロアリール」に関して、用語「任意に置換された」は、該基が、ヒドロキシ(エノール系に存在しているとき、互変異性ケト体で存在してもよい)、 $C_{1-6}$ -アルキル、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、オキソ(互変異性エノール体で表されてもよい)、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、ホルミル、アリール、アリールオキシ、アリールオキシカルボニル、アリールカルボニル、ヘテロアリール、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ；カルバモイル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノカルボニル、アミノカルボニル、アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノ- $C_{1-6}$ -アルキル-アミノカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニルアミノ、シアノ、グアニジノ、カルバミド、 $C_{1-6}$ -アルカノイルオキシ、スルホノ、 $C_{1-6}$ -アルキルスルホニルオキシ、ニトロ、スルファニル、ジハロゲン- $C_{1-4}$ -アルキル、トリハロゲン- $C_{1-4}$ -アルキル、ハロゲン[ここで、置換基を表すアリールおよびヘテロアリールは、 $C_{1-4}$ -アルキル、 $C_{1-4}$ -アルコキシ、ニトロ、シアノ、アミノまたはハロゲンで1~3回置換されていてもよい]から選択された基で、1または何回か、好ましくは1~5回、特に1~3回、置換されていてもよいことを意味する。好ましい例は、ヒドロキシ、 $C_{1-6}$ -アルキル、 $C_{1-6}$ -アルコキシ、カルボキシ、 $C_{1-6}$ -アルコキシカルボニル、 $C_{1-6}$ -アルキルカルボニル、アリール、アミノ、モノおよびジ( $C_{1-6}$ -アルキル)アミノおよびハロゲン[ここで、アリールは、 $C_{1-4}$ -アルキル、 $C_{1-4}$ -アルコキシ、ニトロ、シアノ、アミノまたはハロゲンで1~3回置換されていてもよい]である。

## 【0170】

「ハロゲン」には、フルオロ、クロロ、ブロモおよびヨードを含む。

## 【0171】

オリゴマー(その中にLNAが組みこまれている)およびLNAそれ自体には、可能なそれらの塩を含み、その医薬的に許容な塩が特に適切であると、理解されるであろう。塩には酸付加塩および塩基性塩を含む。酸付加塩の例は、塩酸塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、カリウム塩等である。塩基性塩の例は、(残りの)対イオンが、ナトリウムおよびカリウムのようなアルカリ金属、カルシウムのようなアルカリ土類金属およびアンモニウムイオン ( $^+N(R^g)_3R^h$  [ここで、 $R^g$ およ

び  $R^h$  の各々は、任意に置換された  $C_{1-6}$ -アルキル、任意に置換された  $C_{2-6}$ -アルケニル、任意に置換されたアリールまたは任意に置換されたヘテロアリールを独立して意味する] から選択される塩である。医薬的に許容な塩は、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mack Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 およびより最近の版および Encyclopedia of Pharmaceutical Technology に記載されているものである。従って、ここで用いられる用語「それらの酸付加塩または塩基性塩」は、そのような塩を含むように意図している。さらに、オリゴマーおよび LNA ならびにいずれのその中間体または出発原料もまた、水和物の形態で存在してもよい。

### 【0172】

(モノマーの製造)

好ましい具体例において、付加的な 2'-O,4'-C-結合環を含むヌクレオシドは、以下の方法により合成された。

### 【0173】

多数の 4'-C-ヒドロキシメチルヌクレオシドの合成は、初期に報告されていた (R. D. Youssefye, J. P. H. Verheyden および J. G. Moffatt, J. Org. Chem., 1979, 44, 1301; G. H. Jones, M. Taniguchi, D. Tegg および J. G. Moffatt, J. Org. Chem., 1979, 44, 1309; C. O-Yang, H. Y. Wu, E. B. Fraser-Smith および K. A. M. Walker, Tetrahedron Lett., 1992, 33, 37; H. Thrane, J. Fensholdt, M. Regner および J. Wengel, Tetrahedron, 1995, 51, 10389; K. D. Nielsen, F. Kirpekar, P. Roepstorff および J. Wengel, Bioorg. Med. Chem., 1995, 3, 1493)。2'-O,4'-C-結合 2 環式ヌクレオシドの合成の例として、4'-C-ヒドロキシメチルフラノース誘導体 31 から出発する方法を選択した。

ベンジル化、アセチル化およびアセトトリシス統いて別のアセチル化により、ヌクレオシドカップリングのキー中間体であるフラノース 33 を与える。シリル化されたチミンとの立体選択的反応により、化合物 34 を与え、それを脱アセチル化してヌクレオシドジオール 35 を与えた。トシリ化、引き続き塩基-誘導的閉環により 2'-O,4'-C-結合 2 環式ヌクレオシド誘導体 36 を与えた。脱ベンジル化により保護されていない 2 環式 ヌクレオシド類似体 37 を生じ、それを 5'-O-4,

4'-ジメトキシトリチル保護類似体 38 へ、および続いてオリゴヌクレオチド合成用ホスホルアミダイト誘導体 39 へ変換した。同様の方法を、実施例部分において例示したように、対応するウラシル、アデニン、シトシンおよびグアニンヌクレオシドの合成に使用した。このカップリング方法は、当該分野の当業者にとって明らかであろう幾つかの可能な方法のほんの一つである。前もって形成された (preformed) ヌクレオシドから出発する方法も可能である。従って、例えば、ウリジン誘導体 62 の誘導体 44 への変換は、トシリ化、脱イソプロピリデン化および塩基-誘導的閉環によりうまく達成された。別の例として、ヌクレオシド 67 のヌクレオシド 61B への変換は、図 34 に記載されているように達成された。<sup>2</sup>環式チミンヌクレオシド 37 の対応する 5-メチル-シトシンヌクレオシド 65 への変換は、トリアゾールおよび  $\text{POCl}_3$  を使用する公知反応連続、引き続きベンジル化およびアンモニアによる処理により達成された。同様の方法が 44 からの 57C の合成にも適用可能であろう。別の可能な方法の例としては、既に付加的な環を含む予備環化されたフラノース誘導体を、核塩基誘導体とカップリングするものが可能である。そのような方法は、さらに対応する  $\alpha$ -ヌクレオシド類似体も合成できるであろう。保護されたメチルフラノシドとの  $4\text{-C},2\text{-O}$ -メチレン-D-リボフラノースのカップリングにおいて、我々は主に環の開環した生成物を得た。しかし、 $1\text{-O}$ -アセチルフラノース 207 またはチオフェニルフラノース 212 のカップリングによっては、单一生成物として、うまく  $\alpha$ -アノマーとの LNA ヌクレオシドを生じた。そのような  $\alpha$ -LNA ヌクレオシドの組み込みは、通常のオリゴマー化技術を使用して可能であり (Zを含有する LNA オリゴマーに関して)、 $\alpha$ -LNA オリゴマーを生じる。加えて、環閉環用に既に活性化された  $4'\text{-C}$ -ヒドロキシメチルフラノース (例えば  $4'\text{-C}$ -ヒドロキシメチル基にメシリルまたはトシリル基を含むことにより)を使用するヌクレオシドカップリングを行う合成的方法は、フラノース 78 のヌクレオシド 79 への変換、引き続いて脱保護および環閉環して 36 を与えることにより例示されるのが可能である。適当なフラノース誘導体またはヌクレオシドの化学的もしくは酵素的グリコシド変換反応またはアノマー化は、今のところ他の可能な合成的方法である。これらのおよび他の関連する方法により、他の核塩基またはそれらの類似体を含有する <sup>2</sup>環式

ヌクレオシドの合成を、これらの核塩基または類似体とカップリングするか、または予め形成されたヌクレオシド誘導体から出発することのいずれかにより、可能とする。

#### 【0174】

記載された例は、この発明の方法および実施例を説明するためのものであることを意味する。合成された化合物の構造は、1D または 2D NMR 技術、例えば、NOE 実験を用いて確認した。

#### 【0175】

本発明の付加的な具体例は、異なるサイズかつ異なる化学構造の付加的な環を含有する 2 環式ヌクレオシドを提供することである。記載された方法から、他のヌクレオシドの環化が同様な方法を用いて可能であり、異なる C- 枝分かれを含有するヌクレオシドも、同様であることは、有機合成分野の当業者には明らかである。当該分野の当業者は、文献中に、例えば、国際特許出願公開第 WO 96/143 29 号参照、置換されたヌクレオシド類似体中間体の合成のための、示唆および手本を見出すことができるであろう。異なる化学組成の環を考慮すると、同様な方法または有機化学の分野でよく確立された方法を使用すると、例示したオキソ類似体の例えばチオ類似体の合成は、対応するアミノ類似体の合成のように可能であることは明らかである(例えば求核的置換反応または還元的アルキル化を使用して)。

#### 【0176】

実施例部分において、アミノ LNA 類似体 73~74F の合成を記載している。7  
4 および 74D のオリゴマー化用標準的なビルディングブロックへの変換は、5  
'-O-DMT 保護および 3'-O-ホスフィチレーション (phosphitylation) 引き続い  
ての標準的な方法により可能であった。アミノ LNA 類似体には、2'-アミノ官  
能基の保護が統制された直鎖状オリゴマー化のために必要である。そのような保  
護は、例えば、Fmoc、トリフルオロアセチルまたは BOC のような標準的なアミ  
ノ基保護技術を使用して達成することができる。代わりに、N-アルキル基(例え  
ば、ベンジル、メチル、エチル、プロピルまたは官能基化されたアルキル)は、  
ヌクレオシド変換およびオリゴマー化の間、保つことができる。図 35 および 3

6において、N-トリフルオロアセチルおよびN-メチル誘導体を使用する方法を示す。図37に概要するように、ヌクレオシド75の2'-チオ-LNAヌクレオシド類似体76Dへの変換は、うまく行われ、引き続いてのホスホルアミダイト誘導体76Fの合成もうまく行われた。化合物76Fは、2'-チオ-LNAオリゴヌクレオチドの自動合成用に必要な構造を有している。N-トリフルオロアセチル2'-アミノ-LNAシントン74Aは、2'-アミノ-LNAオリゴヌクレオチドの自動合成用に必要な構造を有している。

### 【0177】

2'-チオおよび2'-アミノLNAヌクレオシドの対応するシトシン、グアニンおよびアデニン誘導体の合成は、図35、36および37に示されるものと同様の方法を使用して達成することができる。代わりに、C-2'の立体化学は環化の前に、便利に配置された、例えばアラビノ配置、フラノールシントンを使用することにより、またはリボ-配置のヌクレオシド/フラノースから出発したC-2'炭素原子の配置を反転させることにより反転することができる。 $2'-\beta-\text{OH}$ の続く活性化、例えばトシリ化、上記に例示したウラシル/チミンにおけるような二重求核置換は、望ましい2環式2'-チオ-LNAまたは2'-アミノ-LNAヌクレオシドを提供することが可能である。そのようにして得られた適当に保護されたシトシン、グアニンおよびアデニン類似体は、他の例として上記で記載したように標準的な反応(DMT-保護およびホスフィチレーション)を使用してオリゴマー化用に合成することが可能である。

### 【0178】

(オリゴマーの合成)

本発明の直鎖状-、分岐状- (M. Grotli および B. S. Sproat, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1995, 495; R. H. E. Hudson および M. J. Damha, J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 2119; M. Von Buren, G. V. Petersen, K. Rasmussen, G. Brandenburg, J. Wengel および F. Kirpekar, Tetrahedron, 1995, 51, 849  
1) および 環状- (G. Prakash および E. T. Kool, J. Am. Chem. Soc., 1992, 114, 3523) オリゴ- およびポリヌクレオチドは、有機化学分野の当業者によく知られた核酸化学の重合技術を使用して合成してもよい。ホスホルアミダイト化

学(S. L. Beaucage および R. P. Iyer, Tetrahedron, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage および R. P. Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223)を使用したが、しかし例えば  $^1\text{H}$ -ホスホネート化学、ホスホトリエステル化学または酵素的合成もまた使用できうる。通常、標準的なカップリング条件およびホスホルアミダイトアプローチを使用したが、この発明の幾つかのモノマーについては、より長いカップリング時間および/または新鮮な試薬での繰り返しカップリングおよび/またはより濃縮されたカップリング試薬を使用した。別の可能性として、 $^{1\text{H}}$ -テトラゾールより活性な活性化剤も、カップリング反応速度を増加させるのに使用できる。ホスホロアミダイト 39、46、53、57D、61D および 66 すべては、>95% の逐次的カップリング収率を満たして結合した。全-ホスホロチオエート LNA オリゴマー(表 7)を標準的な方法を使用して合成した。従って、ホスホジエステルオリゴマーの合成で使用される通常の、例えばヨウ素/ピリジン/ $\text{H}_2\text{O}$ 、酸化を、Beaucage's 試薬(市販で入手可能)を使用する酸化と交換することにより、ホスホチオエート LNA オリゴマーを効率的に合成した(逐次的カップリング収率  $\geq 98\%$ )。 $2'$ -アミノ-LNA および  $2'$ -メチルアミノ-LNA オリゴヌクレオチド(表 9)をアミダイト 74A および 74F を使用して効率的に合成した(逐次的カップリング収率  $\geq 98\%$ )。 $2'$ -チオ-LNA オリゴヌクレオチド(表 8)を、LNA オリゴヌクレオチド用に上記で記載したような、標準的なホスホルアミダイト方法を使用するアミダイト 76F を使用して、効率的に合成した。所望の配列の合成の後、後処理を標準的な条件を使用して行った(固形支持体からの開裂および 55 °C で 5 時間 30% アンモニアを使用する保護基の除去)。LNA オリゴヌクレオチドの精製を、使い捨ての逆相精製カートリッジおよび/または逆相 HPLC および/またはエタノールもしくはブタノールから沈殿させることを使用して行った。キャピラリーゲル電気泳動、逆相 HPLC および MALDI-MS を使用して合成したオリゴヌクレオチド類似体の純度を確認し、かつ本発明の 2 環式 ヌクレオシド類似体の所望な数が予期したように組みこまれていることの確認をした。

### 【0179】

本発明の付加的な観点は、非天然なヌクレオシド間結合により結合した LNA を含有するオリゴヌクレオチド類似体の製法を提供することである。例えば、対

応するホスホロチオエートまたはホスホロアミダイト類似体の合成は、オリゴヌクレオチド化学(Protocols for Oligonucleotides and Analogs, vol 20, (Sudhir Agrawal, ed.), Humana Press, 1993, Totowa, NJ; S. L. Beaucage および R. P. Iyer, Tetrahedron, 1993, 49, 6123; S. L. Beaucage および R. P. Iyer, Tetrahedron, 1992, 48, 2223; E. Uhlmann および A. Peyman, Chem. Rev., 90, 543)の分野でよく確立された方法を使用することにより可能である。

### 【0180】

従って、通常、本発明はまた、LNA修飾オリゴヌクレオチドの製造用にここに定義したようなLNAの使用を提供する。LNA修飾オリゴヌクレオチドは、正常なヌクレオシド(すなわち、リボヌクレオシドおよび/またはジオキシリボヌクレオシドのような天然に存在するヌクレオシド)、および一般式IIで定義されるものとは異なる修飾されたヌクレオシドからなってもよいことは理解されるであろう。特に興味深い具体例において、LNAの組み込みは、オリゴヌクレオチドの可能性を調節し、核酸活性酵素の基質としてあるまう。

### 【0181】

さらに、任意に保護された核塩基および任意に5'-OH保護されたLNAがそこに固定された固体支持体材料は、LNAモノマーが3'末端に含まれているLNA修飾オリゴヌクレオチド合成の材料として特に興味深い。この場合、固体支持体材料は、CPGが好ましく、例えば容易に(市販で)入手可能なCPG材料である。その上に、3'-官能基化された、任意に保護された核塩基および任意に5'-OH保護されたLNAは、特定な材料用の供給者により示された条件を使用して結合される。BioGenex Universal CPG Support (BioGenex, U.S.A.)は、例えば使用することができる。5'-OH保護基は、例えばDMT基であってもよい。3'-官能基は該CPG材料に適用可能な条件を充分考慮して選択されるべきである。

### 【0182】

(適用)

この発明は、種々の新規な2環式オリゴヌクレオシドモノマーの誘導体(LNA)がオリゴヌクレオチドに組みこまれると、これらの修飾されたオリゴヌクレオチドが、修飾されていないオリゴヌクレオチドに比べ、相補的ssDNAおよびssRNAの

両方に対して劇的に高い親和性を示すという意外な発見を開示する。この発明はまた、完全にLNA修飾オリゴヌクレオチドおよび部分的にLNA修飾オリゴヌクレオチドが、それらの相補的核酸配列に対して非常に高いハイブリッド化特性を示すという意外な発見を開示する。適用に応じてこれらのLNAを用いることによって、標準的なオリゴヌクレオチドにおいて、特異性が脅かされることなく親和性が大いに高まる（オリゴヌクレオチドの一定の大きさ）、あるいは親和性が脅かされることなく特異性が非常に高まる（オリゴヌクレオチドの大きさの縮減）かのいずれかに興味をそそる可能性が提供される。この発明はまた、LNA修飾オリゴヌクレオチドが、非常に高いハイブリッド化特性に加え、正常なDNAオリゴヌクレオチドおよびRNAオリゴヌクレオチドの有用な物理化学特性の多くを示すという意外な発見を開示する。ここに挙げる例としては、LNA修飾オリゴヌクレオチドの優れた溶解性、塩化ナトリウムおよびテトラメチルアンモニウムクロリドのような塩に対する反応性（修飾されていないオリゴヌクレオチドのそれによく似ている）、種々のポリメラーゼのプライマーとして作用するLNA修飾オリゴヌクレオチドの能力、熱安定性DNAポリメラーゼを用いたターゲット增幅反応においてプライマーとして作用するLNA修飾オリゴヌクレオチドの能力、T4ポリヌクレオチドキナーゼの基質として作用するLNA修飾オリゴヌクレオチドの能力、ストレプタビジン(streptavidine)被覆した固体表面上にPCRアンプリコンを配列特異的に捕捉するビオチニル化された(biotinylated)LNAの能力、アンプリコンを配列特異的に捕捉する固定化されたLNA修飾オリゴヌクレオチドの能力、および鎖侵入(invasion)による、2本鎖DNAを配列特異的にターゲットするLNA修飾オリゴヌクレオチドの非常に重要な能力が含まれる。したがって、これらの新規なヌクレオシド類似体が、治療、診断および分子生物学におけるオリゴヌクレオチドベースの技術の実施全般を向上させる非常に有用な道具であることは当業者にとって明らかである。

### 【0183】

この発明の目的は、オリゴヌクレオチドの合成での当業者に公知の手順および装置を用い、オリゴヌクレオチドに組みこまれうる、この発明によるモノマー性(単量体)LNAを提供することである。

### 【0184】

この発明の別の目的は、相補的オリゴヌクレオチドに配列特異的にハイブリッド化し、修飾されていないオリゴヌクレオチドによって形成された対応する複合体よりも親和性が実質的に高い2重らせんあるいは3重らせんのいずれかを形成することのできる、完全にあるいは部分的にLNA修飾オリゴヌクレオチド（オリゴマー）を提供することである。

### 【0185】

この発明の別の目的は、LNAを用い、親和性を脅かすことなく正常なオリゴヌクレオチドの特異性を高めることである。これは、正常なオリゴヌクレオチドの大きさを（したがって親和性を）小さくして、LNAを組み込むことによって生じる親和性の増大に釣り合うようにすることによって達成されうる。

### 【0186】

この発明の別の目的は、LNA、正常なヌクレオシドおよび他のヌクレオシドを含む完全における部分的に修飾されたオリゴヌクレオチドを提供することである。

### 【0187】

この発明のさらに別の目的は、LNAの高い親和性を活用し、「鎖置換」によってdsDNA分子におけるターゲット配列に結合できる非常に高い親和性を有する修飾されたオリゴヌクレオチドを作ることである。

### 【0188】

この発明のさらに別の目的は、オリゴヌクレオチドに組み込まれると、その相補的ヌクレオシドに対する親和性が異なる種々のクラスのLNAを提供することである。この発明によると、これは、正常な核酸G、A、T、CおよびUを例えれば改変(altered)水素結合可能性を有する誘導体で置換することによって、あるいは主鎖構造の異なるLNAを用いることによって達成される。このような種々のLNAを利用することによって、修飾されたオリゴヌクレオチドの親和性を大きく変えることができる。

### 【0189】

この発明の別の目的は、ヌクレアーゼに対する耐性が、修飾されていないオリ

ゴヌクレオチドよりも高いLNA修飾オリゴヌクレオチドを提供することである。

#### 【0190】

この発明の別の目的は、RNaseHをリクルートすることのできるLNA修飾オリゴヌクレオチドを提供することである。

#### 【0191】

この発明の別の目的は、DNAおよびRNAポリメラーゼの基質として作用し、それによって成長(growing)核酸鎖に取りこまれるか、あるいは鎖終結因子として作用することのできるLNAを提供することである。

#### 【0192】

この発明のさらに別の目的は、治療剤として作用しうるLNAを提供することである。治療用ヌクレオシド類似体の多くの例は公知のものであり、ここに開示されているヌクレオシド類似体に類似した誘導体は、以下の文献から公知の方法を用いて合成できる (E. De Clercq, J. Med. Chem. 1995, 38, 2491; P. Herdewijn および E. De Clercq: Classical Antiviral Agents and Design og New Antiviral Agents. In: A Textbook of Drug Design and Development; Eds. P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors および U. Madsen; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p. 425; I. K. Larsen: Anticancer Agents. In: A Textbook of Drug Design and Development; Eds. P. Krogsgaard-Larsen, T. Liljefors および U. Madsen; Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1996, p. 460)。

#### 【0193】

2本鎖RNAは、抗ウィルス活性および腫瘍抑圧活性を有することが明らかにされている。(Sharp ら, Eur. J. Biochem. 230(1): 97-103, 1995, Lengyel-P. ら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 90(13): 5893-5, 1993, および Laurent-Crawford ら, AIDS Res. Hum. Retroviruses, 8(2): 285-90, 1992)。2本鎖LNAsには、治療活性を有する2本鎖RNAの効果と同様の効果があるかもしれません、したがってこのような2本鎖LNAは治療薬としての可能性がある。

#### 【0194】

ここで用いる用語「天然の核酸」は、広い意味での核酸、例えばあらゆる由来

の無傷な細胞あるいはウイルス (vira) に存在する核酸、化学的または物理的手段によってそうしたソースから放出される核酸、あるいは増幅によってそうした一次ソースから派生する核酸を称する。天然の核酸は、1本鎖、2本鎖、または部分的な2本鎖であってもよく、比較的純粋なものあるいは異なる核酸を混合したものであってもよい。また、他の核酸や他の細胞成分を含有する粗な生物学的試料の成分であってもよい。一方、「合成の核酸」は、化学的な合成によって製造されたあらゆる核酸を称する。

### 【0195】

また、この発明は、核酸ベースの治療、診断および分子生物学におけるLNA修飾オリゴヌクレオチドの用途を提供する。LNA修飾オリゴヌクレオチドは、天然あるいは合成の核酸の検出、同定、捕捉、評価、定量およびフラグメンテーションに用いられるとともに、生体内および試験管内での翻訳および転移ブロック剤として用いられる。多くの場合、様々の分子をLNA修飾オリゴヌクレオチドに結合させるのは興味深いことであるだろう。こうした分子は、オリゴヌクレオチドのいずれかの末端に結合させるか、またはその内部の1つより多い位置に結合させてもよい。あるいは、5'または3'末端に連結させたスペーサーを介してオリゴヌクレオチドに結合させてもよい。こうした分子の代表的な基としては、DNAインターラーカレーター、光化学的活性基、熱化学的活性基、キレート基、リポーター基およびリガンドである。一般に、修飾されていないDNAおよびRNAオリゴヌクレオチドをこれらの分子で標識を付ける方法は全て、LNA修飾オリゴヌクレオチドに標識を付けるのに用いることができる。同様に、標識を受けたオリゴヌクレオチドを検出するのに用いる方法は全て、対応する標識を受けたLNA修飾オリゴヌクレオチドに適用できる。

### 【0196】

(治療)

用語「鎖置換」は、オリゴヌクレオチドが、ターゲット鎖から他方の鎖を置き換えさせるように、2本鎖DNAまたはRNAにおけるその相補的ターゲット配列に結合するプロセスに関する。

### 【0197】

この発明の1つの観点では、「鎖置換」を行いうるLNA修飾ヌクレオチドは、「アンチ遺伝子」アプローチに基づく新規な薬剤の開発に活用される。三重らせんを形成しうるオリゴヌクレオチドとは対照的に、こうした「鎖置換」オリゴヌクレオチドでは、dsDNA中のいかなる配列をもターゲットにできかつ生理的イオン強度およびpHでのターゲットが可能である。

#### 【0198】

「鎖置換」オリゴヌクレオチドは、分子内水素結合ゆえにRNAターゲット配列にアクセスできない場合、アンチセンスアプローチにおいて有利に利用されうる。こうした分子内構造はmRNA中に生じうるので、アンチセンスアプローチによってmRNAの翻訳を「シャットダウン」しようとする場合に大きな問題となる。

#### 【0199】

他のクラスの細胞RNA、例えばtRNA、rRNA、snRNAおよびscRNAは、その機能上重要な細胞内構造を含んでいる。これらのクラスの高度に構成されたRNAは、タンパク質をエンコードするのではなく、mRNAのスプライシング、ポリアデニル化、翻訳、校正、染色体末端の完全性の維持のような一定の範囲の細胞機能に(RNA/タンパク質粒子の形態で)関与している。その高度な構造は、正常オリゴヌクレオチドの有効なハイブリッド化を損なうあるいは阻止するものであるため、このクラスのRNAは従来、アンチセンスタークリップとしての注目は集めていなかった。

#### 【0200】

高い親和性のLNAモノマーを用いることによって、このようなターゲットRNAと有効にハイブリッド化する、十分な熱安定性を有するアンチセンスプローブを構成することが容易になるはずである。したがって、好ましい実施例では、LNAを用いてオリゴヌクレオチドに十分な親和性を持たせ、これらのクラスのRNAとハイブリッド化させ、それによってRNAの含まれる粒子の機能の数および/質を調節する。

#### 【0201】

ある場合には、遺伝子の発現を抑制することが有利であり、他の場合には活性化することが有利であるかもしれない。Møllegaardらによって示されているよ

うに(Mollegaard, N. E.; Buchardt, O.; Egholm, M.; Nielsen, P. E. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1994, 91, 3892)、「鎖置換」することのできるオリゴマーは、RNA転写活性化因子としても機能しうる。この発明の1つの観点では、「鎖置換」することのできるLNAは、治療目的において興味ある遺伝子を活性化するのに用いられる。

#### 【0202】

多数のウィルス感染症および癌の化学療法において、ヌクレオシドおよびヌクレオシド類似体は効果的であることがわかっている。LNAヌクレオシドは、そうしたヌクレオシドベースの薬剤として有用である可能性がある。

#### 【0203】

種々のタイプの2本鎖RNAは、いくつかのタイプの癌の成長を抑える。1個以上のLNAオリゴヌクレオチドを含む2重らせんは、そうした2本鎖の薬剤として有用である可能性がある。

#### 【0204】

この発明はまた、医薬的に許容されうるキャリヤーと組み合わされる、上に定義された医薬的に活性なLNA修飾オリゴヌクレオチドあるいは医薬的に活性なLNAモノマーからなる医薬組成物に関する。

#### 【0205】

こうした組成物は、経口投与、非経口投与（静脈投与、腹腔内投与）、筋内投与（筋肉内投与）、直腸投与、鼻腔内投与（鼻内投与）、皮膚投与、臍投与、頬側投与（頬投与）、眼球投与、肺投与（肺静脈投与）に適した形態、好ましくは経口投与に適した形態であってもよく、そのような組成物は例えば一般的に"Remington's Pharmaceutical Sciences", 17. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Lippincott Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985 とさらに最近の版、および"Drugs and the Pharmaceutical Sciences" series, Marcel Dekkerにおける研究論文に記載されているような、当業者に公知の方法で調製されてもよい。

#### 【0206】

##### (診断)

種々のオリゴヌクレオチドのパネルを利用し、同時にターゲット核酸を分析し

て過度の突然変異の存在している可能性を調べるためにいくつかの診断的および分子生物学的方法が開発されている。代表的には、オリゴヌクレオチドパネルは、固体支持体上にあらかじめ決められたパターンで固定されており、ターゲット核酸において特定の突然変異の存在が、その核酸がハイブリダイズする固体支持体上の位置によって明らかとなる。核酸の分析における種々のオリゴヌクレオチドのパネルがうまく用いられるための1つの重要な必要条件は、1つの適用されたハイブリッド化の条件の下で、それらがその特定のターゲット配列に全て特異的であることである。標準的オリゴヌクレオチドの、その相補的ターゲット配列に対する親和性および特異性は、その配列およびサイズに大きく依存するので、この規範を満たすのは従来、困難であった。

### 【0207】

したがって、好ましい実施例では、LNAは、プローブの親和性および／あるいは特異性を高める手段として、および種々のオリゴヌクレオチドの、その相補的配列に対する親和性を等しくする手段として用いられる。ここに開示しているように、こうした親和性の調節は、例えばオリゴヌクレオチドにおける選択されたヌクレオシドを、同様の核塩基を保持するLNAを有するオリゴヌクレオチドに置き換えることによって達成されうる。さらにここに示すように、種々のクラスのLNAは、その相補的ヌクレオシドに対して種々の親和性を示す。例えば、T-核塩基を有する2-3橋かけLNAは、対応する2-4橋かけLNAよりもA-ヌクレオシドに対する親和性が低い。したがって、種々のクラスのLNAを用いることによって、オリゴヌクレオチドの親和性を細かく調整するための追加のレベルが提供される。

### 【0208】

別の好ましい実施例では、LNA修飾オリゴヌクレオチドの高い親和性および特異性が、天然の核酸および合成の核酸の配列特異的捕捉および精製において活用される。一つの観点では、天然の核酸あるいは合成の核酸を、固体表面上に固定されたLNA修飾オリゴヌクレオチドに接触させる。この場合、ハイブリッド化と捕捉は同時に生じる。捕捉された核酸は例えば、当該分野において公知の様々な方法によってこの表面上で直接に検出、評価、定量、増幅されてもよい。あるいは、こうした評価あるいは増幅を行う前に、この固定した修飾オリゴヌクレオチ

ドおよび捕捉した核酸を熱などのデハイブリッド化状態に付すこと、あるいはイオン強度の低い緩衝液を用いることによって、表面から放出されてもよい。

### 【0209】

この固体支持体は、例えばCPG（制御された気孔ガラス）、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネートあるいはポリエチレンのような広範なポリマー材料から選択してもよく、例えばチューブ、マイクロタイタープレート、ステイック、ビーズ、フィルターなどの様々な形態をとってもよい。**LNA修飾オリゴヌクレオチド**は、その5'末端あるいは3'末端を介して（あるいは5'あるいは3'末端に結合されたリンカーの末端を介して）、オリゴヌクレオチドを固定するのに通常用いられる様々な化学的あるいは光化学的方法によって、あるいは固定されたストレプタビジンと、例えばビオチニル化**LNA修飾オリゴヌクレオチド**との結合などの非共有結合によって固体支持体に固定してもよい。**LNA修飾オリゴヌクレオチド**を種々の固体支持体上に固定する一つの好ましい方法は、（国際特許出願公開第WO 96/31557号）に記載されているように、修飾されたオリゴヌクレオチドの5'末端あるいは3'末端に（任意にリンカーを介し）共有結合によって結合された光化学的に活性なアントラキノンを光化学的に用いることである。したがって、この発明はまた、**LNA修飾オリゴヌクレオチド**を有する表面を提供することである。

### 【0210】

別の観点では、**LNA修飾オリゴヌクレオチド**は、5'末端あるいは3'末端のいずれかに共有結合によって結合された配位子を有する。この場合、**LNA修飾オリゴヌクレオチド**を天然の核酸あるいは合成の核酸に溶液中で接触させ、一方、形成されたハイブリッドを、リガンドに特異的に結合できる分子を有する固体支持体上に捕捉する。

### 【0211】

さらに別の観点では、「鎖置換」を行うことのできる**LNA修飾オリゴヌクレオチド**を、予備変性なしに、天然の核酸および合成の核酸の捕捉に用いる。このような修飾オリゴヌクレオチドは、安定した細胞内構造の急速な形成により正常なオリゴヌクレオチドがターゲット配列にアクセスすることが難しいか不可能であ

る場合に、特に有用である。こうした構造を有する核酸の例としては、rRNA、tRNA、snRNAおよびscRNAが挙げられる。

### 【0212】

別の好ましい実施例では、高い特異性を目的として設計されたLNA修飾オリゴヌクレオチドが、核酸の配列決定におけるプライマーとして、およびPCR反応のようないくつかの公知の增幅反応のいずれかにおけるプライマーとして用いられる。ここで示されるように、LNA修飾オリゴヌクレオチドの設計によって、指数ターゲット増幅あるいは直線状ターゲット増幅が維持されるか否かが決定される。通常のDNAプライマーで生成した増幅生成物の分析に適用可能な様々な方法によって、増幅反応生成物を分析することができる。直線状増幅を維持するようためにLNA修飾オリゴヌクレオチドプライマーを設計する特定な場合、得られたアンプリコンは、変性なしに相補的プローブによってターゲットされうる1本鎖末端を有するであろう。こうした末端は例えば、固体表面に取り付けた他の相補的LNA修飾オリゴヌクレオチドによってアンプリコンを捕捉するのに用いられるであろう。

### 【0213】

別の観点では、「鎖置換」のできるLNA修飾オリゴは、直線状増幅反応あるいは指数増幅反応のいずれかにおいてプライマーとして用いることができる。このようにオリゴを用いることにより、増幅反応の後の工程におけるアンプリコン再ハイブリッド化と効果的に競争し、全アンプリコン収率が高まることが期待される。Demersら(Nucl. Acid Res. 1995, Vol 23, 3050-3055)は、PCR反応の全収率を増大させる手段として、高親和性および非伸長性を有するオリゴの用途を開示している。PCRの後の工程でアンプリコン再ハイブリダイゼーションを妨げることによって、オリゴマーがこれらの効果を惹起すると考えられる。3'末端でブロックされたLNA修飾オリゴが同様な利点を提供することが期待される。3'末端でのブロッキングは、例えば3'のヒドロキシ基を水素あるいはホスフェートへ交換するなどの多くの方法によって達成されうる。こうした3'末端でブロックされたLNA修飾オリゴはまた、Yuら(Biotechniques, 1997, 23, 714-716)に記載の方法と同様の方法において、密接に関連した核酸配列を選択的に増幅するの

に用いられる。

#### 【0214】

近年、例えばターゲット增幅反応によって生成したアンプリコンのリアルタイムでの検出などに用いられる新規なクラスのプローブが発明された。あるそのようなクラスのプローブは、「分子標識 (Molecular Beacons)」と称されている。これらのプローブは、一端に発蛍光団 (fluorophor) を、他端にクエンチャー分子 (quencher molecule) を含む部分的自己相補的オリゴスクレオチドとして合成される。溶液中で遊離であるとき、プローブは、(自己相補的領域によって案内される) ヘアピン構造に折り重なり、これによってクエンチャーが発蛍光団の十分に近くに配され、その蛍光信号が消滅する。ヘアピンは、そのターゲット核酸とハイブリッド化すると、開き、それによって発蛍光団とクエンチャーを分離するとともに蛍光信号を発する。

#### 【0215】

別のクラスのプローブは「タックマン (Taqman) プローブ」と称されている。これらのプローブはまた、発蛍光団とクエンチャー分子を含んでいる。しかしながら、分子標識とは反対に、発蛍光団から蛍光信号を消去するクエンチャーの能力は、プローブがそのターゲット配列とハイブリッド化した後も維持される。その代わり、蛍光信号は、5' に位置するプライマーからタックマンプローブの結合部位への合成を開始するポリメラーゼの 5' エクソヌクレアーゼ活性によりプローブからクエンチャーあるいは発蛍光団のいずれかが物理的に離脱することによって、ハイブリッド化の後に生じる。

#### 【0216】

ターゲット部位の高い親和性は、両タイプのプローブの重要な特徴であり、このためこうしたプローブはかなり大きくなる傾向がある（代表的には30~40量体）。その結果、高品質のプローブの作製では重大な問題が生じる。したがって、好ましい実施例では、サイズを縮減しつつ要求される親和性を維持することによってタックマンプローブおよび分子標識の作製およびその後の性能を向上させるために、LNAが用いられる。

#### 【0217】

さらに別の観点では、新しい親和性の対（完全に修飾されたオリゴヌクレオチドあるいは部分的に修飾されたオリゴヌクレオチドのいずれか）を形成するためには、LNAが用いられる。親和性定数は広範囲で容易に調節することができ、非常に多くの親和性の対を設計し合成することができる。親和性の対の一部を関心のある分子（例えばタンパク質、アンブリコン、酵素、ポリサッカライド、抗体、ペプテン、ペプチド、PNAなど）に標準的な方法によって結合することができ、親和性な対の他の部分は、例えば、ビーズ、膜、マイクロタイタープレート、スティック、チューブなどの固体支持体に取り付けることができる。固体支持体は、例えばポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネートあるいはポリエチレンのような広範なポリマー材料から選択してもよい。親和性な対は、上記の様々なターゲット分子の選択的分離、精製、捕捉および検出に用いてもよい。

#### 【0218】

別の相補的LNAオリゴヌクレオチド（完全に修飾したものあるいは部分的に修飾したもの）との相互作用により、LNA標識付きの分子を捕捉するという原理を用い、莫大な数の新規な親和性な対を形成することができる。

#### 【0219】

別の好ましい実施例では、LNA修飾オリゴヌクレオチドの高い親和性と特異性が、その場でのハイブリッド化において有用なプローブの形成に活用される。例えば、LNAは、従来のDNAプローブのサイズを縮減するとともに、要求される親和性を維持し、それによってプローブの動態およびサンプル試料を貫通するプローブの能力を高める用いられる。LNA修飾オリゴヌクレオチドが2本鎖核酸構造を「鎖侵入」する能力はまた、その場でのハイブリッド化においてかなり有利であるが、これは、ターゲットDNA/RNAの予備変性なしにハイブリッド化が容易になるからである。

#### 【0220】

別の好ましい実施例では、アンチセンス治療法に用いられるLNA修飾オリゴヌクレオチドが、親和性およびRNaseHをリクルートする能力を高めるという2つの目的で設計される。これは例えば、修飾されていないセントラルDNAセグメントの側面を固めるLNAセグメントを有することによって達成される。

### 【0221】

この発明はまた、天然の核酸あるいは合成の核酸の分離、精製、増幅、検出、同定、定量あるいは捕捉のためのキットを提供するものであって、このキットは、反応本体と、ここで定義する1個以上のLNA修飾オリゴヌクレオチド（オリゴマー）とからなる。LNA修飾オリゴヌクレオチドは、前記反応本体上に固定されるのが好ましい。

### 【0222】

この発明はまた、天然の核酸あるいは合成の核酸の分離、精製、増幅、検出、同定、定量あるいは捕捉のためのキットを提供するものであって、このキットは、反応本体と、ここで定義する1個以上のLNA修飾オリゴヌクレオチドとからなる。LNAは、（例えば上記の固定技術などによって）前記反応本体上に固定されるのが好ましい。

### 【0223】

この発明によるキットに関して、反応本体は、例えばホウケイ酸ガラス、ソーダ石灰、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレングリコールテレフタレート、ポリビニルアセテート、ポリビニルピロリジノン、ポリメチルメタクレートおよびポリビニルクロリドから、好ましくはポリスチレンおよびポリカーボネートから選択された固形支持材料であるのが好ましい。反応本体は、試料チューブ、バイアル、スライド、シート、フィルム、ビーズ、ペレット、ディスク、プレート、リング、ロッド、ネット、フィルター、トレイ、マイクロタイタープレート、スティックあるいはマルチブレードステイックの形態であってもよい。

### 【0224】

キットには、通常、キット使用上の最適条件を記載した指示シートを付ける。

### 【0225】

この発明の上述の診断の観点および治療の観点を以下の実施例で説明する。

### 【0226】

#### 【実施例】

(一般)

試薬は全て製造販売業者から得、さらに精製せずに使用した。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて全ての有機相を乾燥した後、濾過を行った。カラムクロマトグラフィに使用したシリカゲル(0.040~0.063 mm)はMerckより購入した。NMRスペクトルは<sup>1</sup>H NMRには300 MHzまたは250 MHzで、<sup>13</sup>C NMRには62.9 MHzで、また<sup>31</sup>P NMRには202.33 MHzで記録した。 $\delta$ 値は内部標準(<sup>1</sup>H NMRおよび<sup>13</sup>C NMR)としてのテトラメチルシリラン、外部標準(<sup>31</sup>P NMR)としての85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>に関するppmで表す。NMRピークの帰属は標準スクレオシド命名法に従って行った。EI質量スペクトル、FAB質量スペクトルおよびプラズマ脱離質量スペクトルは合成した化合物の分子量に関する情報を得るために記録した。ホスホロアミダイト方法体系を用いてオリゴスクレオチド類似体を合成した。5'-O-DMT-ONまたは5'-O-DMT-OFFオリゴスクレオチド類似体の精製は必要に応じて使い捨ての逆相クロマトグラフィカートリッジまたは逆相HPLCを用いて行った。マトリクス補助レーザ脱離質量スペクトルは典型的なオリゴスクレオチド試料の分子量およびモノマー組成を証明するために得た。典型的なオリゴスクレオチド試料の純度を証明するために毛管ゲル電気泳動を行った。

### 【0227】

下記の具体的な記載は図2~41および表1~10に伴うものである。以下の実施例において特に言及されない場合、「LNA」は図2の式Zに記載の2'-4'-橋かけ異性体を意味する。

### 【0228】

(LNAモノマーの生成)

#### 実施例1

3-C-アリル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラノース(OA)。

方法1: 無水THF (980 cm<sup>3</sup>)中の5-O-t-ブチルジメチルシリル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラン-3-ウロース溶液 (Y. Yoshimura, T. Sano, A. Matsu da および T. Ueda, Chem. Pharm. Bull., 1988, 36, 162) (17.8 g, 58.9 mmol)を0°Cで攪拌し、無水エーテル(130 cm<sup>3</sup>, 130 mmol)中の1 Mアリルマグネシウムプロミドを滴加した。2時間攪拌した後、混合物に塩化アンモニウム飽和水溶液(800 cm<sup>3</sup>)を加え、ジクロロメタン(3 × 400 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相をブライン(

$3 \times 450 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣を無水THF( $700 \text{ cm}^3$ )に溶解した。混合物にTHF( $54.4 \text{ cm}^3$ ,  $59.8 \text{ mmol}$ )中のテトラブチルアンモニウムフルオライド $1.1 \text{ M}$ 溶液を加え、室温で1時間攪拌し、蒸発乾固した。残渣をジクロロメタン( $1700 \text{ cm}^3$ )に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 500 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィでジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いて精製し、白色固体としてフラノースOAを得た(9.42 g, 69%)。方法2:無水THF( $425 \text{ cm}^3$ ); 無水エーテル( $130 \text{ cm}^3$ ,  $130 \text{ mmol}$ )中のアリルマグネシウムプロミド $1 \text{ M}$ 溶液; 塩化アンモニウム飽和水溶液( $490 \text{ cm}^3$ ); 抽出用エーテル( $350 + 2 \times 160 \text{ cm}^3$ ); ブライン( $2 \times 160 \text{ cm}^3$ ); THF ( $22.3 \text{ cm}^3$ ,  $24.6 \text{ mmol}$ )中の $1.1 \text{ M}$ テトラブチルアンモニウムフルオライド溶液; 無水THF( $400 \text{ cm}^3$ ); ジクロロメタン( $1400 \text{ cm}^3$ ); 炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 500 \text{ cm}^3$ ); ブライン( $500 \text{ cm}^3$ )および( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )を用い、フラノースOAを5-O-t-ブチルジフェニルシリル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラン-3-ウロース(T. F. Tam および B. Fraser-Reid, J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1980, 556) (9.5 g,  $22.2 \text{ mmol}$ )から同様に合成した。

## 【0229】

$\delta_{\text{H}}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) 5.84 (1 H, m, 2'-H), 5.65 (1 H, d,  $J$  3.8, 1-H), 5.12 (1H, d,  $J$  6.1, 3'-H<sub>a</sub>), 5.06 (1H, br s, 3'-H<sub>b</sub>), 4.76 (1H, s, 3-OH), 4.64 (1H, t,  $J$  5.4, 5-OH), 4.16 (1 H, d,  $J$  3.8, 2-H), 3.84 (1 H, dd,  $J$  2.2, 8.1, 4-H), 3.56 (1 H, ddd,  $J$  2.3, 5.6, 11.8, 5-H<sub>a</sub>), 3.42 (1 H, m, 5-H<sub>b</sub>), 2.16 (1 H, dd,  $J$  6.1, 14.3, 1'-H<sub>a</sub>), 1.98 (1 H, dd,  $J$  8.2, 14.3, 1'-H<sub>b</sub>), 1.46 (3 H, s, CH<sub>3</sub>), 1.25 (3 H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0230】

$\delta_{\text{C}}$  ( $(\text{CDCl}_3$ ) 133.5 (C-2'), 117.9 (C-3'), 110.8 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 102.9 (C-1), 82.6, 81.0, 77.7 (C-2, C-3, C-4), 59.4 (C-5), 36.4 (C-1'), 26.4, 26.3 (CH<sub>3</sub>)

## 【0231】

(実測値: C, 57.4; H, 8.0; C<sub>11</sub>H<sub>18</sub>O<sub>5</sub> の理論値 C, 57.4; H, 7.9%).

## 【0232】

## 実施例2

3-C-アリル-3,5-ジ-0-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラノース(OB)。

無水DMF(100 cm<sup>3</sup>)中の60%水素化ナトリウム懸濁液(4.9 g, 123 mmol)を0°Cで攪拌し、無水DMF(65 cm<sup>3</sup>)中のフラノース OA溶液(9.42 g, 40.9 mmol)を45分で滴加した。溶液を50°Cで1時間攪拌し、0°Cで冷却した。臭化ベンジル(14.5 cm<sup>3</sup>, 121 mmol)および無水DMF(14.5 cm<sup>3</sup>)の混合物を滴加し、混合物を室温で18時間攪拌した。反応混合物を蒸発乾固させ、ジクロロメタン(700 cm<sup>3</sup>)中の残渣溶液を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 450 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣を石油エーテル/酢酸エチル(9:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、油として化合物OBを得た(14.5 g, 86%)。

## 【0233】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.39–7.21 (10H, m, Bn), 5.92 (1 H, m, 2'-H), 5.71 (1 H, d, J 3.8, 1-H), 5.17–5.09 (2 H, m, 3'-Ha, 3'-H<sub>b</sub>), 4.67 (2 H, m, Bn), 4.60 (1 H, d, J 12.2, Bn), 4.52 (1 H, d, J 12.1, Bn), 4.43 (1 H, m, 4-H), 4.42 (1 H, d, J 3.8, 2-H), 3.73 (1 H, dd, J 3.2, 10.8, 5-H<sub>a</sub>), 3.66 (1 H, dd, J 7.4, 10.8, 5-H<sub>b</sub>), 2.50 (1 H, dd, J 7.7, 14.9, 1'-H<sub>a</sub>), 2.39 (1 H, dd, J 6.5, 14.9, 1'-H<sub>b</sub>), 1.60 (3 H, s, CH<sub>3</sub>), 1.34 (3 H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0234】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 138.7, 138.1 (Bn), 132.6 (C-2'), 128.3, 128.2, 127.7, 127.5, 127.4, 127.4 (Bn), 118.5 (C-3'), 112.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 104.1 (C-1), 86.5, 82.1, 80.4 (C-2, C-3, C-4), 73.4, 68.6 (Bn), 67.0 (C-5), 35.8 (C-1'), 26.8, 26.6 (CH<sub>3</sub>).

## 【0235】

FAB-MS m/z 433 [M+Na]<sup>+</sup>

(実測値: C, 73.4; H, 7.4; C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> の理論値C, 73.2; H, 7.4%).

## 【0236】

## 実施例3

3-C-アリル-1,2-ジ-0-アセチル-3,5-ジ-0-ベンジル-D-リボフラノース (OC)。

80%水性酢酸(150 cm<sup>3</sup>)中のフラノース OB溶液(12.42 g, 30.3 mmol)を90°Cで3時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をエタノール(3 × 75 cm<sup>3</sup>)、トルエン(3 × 75 cm<sup>3</sup>)および無水ピリジン(2 × 75 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させ、無水ピリジン(60 cm<sup>3</sup>)に再び溶解した。無水酢酸(46 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液を室温で48時間攪拌した。水と水の混合物(300 cm<sup>3</sup>)を加え、得られた混合物をジクロロメタン(2 × 300 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 200 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を蒸発させ、残渣を石油エーテル/酢酸エチル(4:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、油としてアノマー混合物OC ( $\beta : \alpha \sim 2:1$ )を得た(13.3 g, 97%)。

## 【0237】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 169.7, 169.6 (C=O), 138.7, 138.4, 137.7, 137.6 (Bn), 132.4, 132.2 (C-2'), 128.4 128.4, 128.2, 128.2, 127.8, 127.7, 127.7, 127.6, 127.3, 127.3, 126.9, 126.8 (Bn), 118.5 (C-3'), 99.4, 93.5 (C-1), 84.8, 83.7, 83.2, 82.0, 79.1, 75.5 (C-2, C-3, C-4), 73.7, 73.5, 69.3, 68.7 (Bn), 66.1 (C-5), 35.5, 34.9 (C-1), 21.1, 21.0, 20.7, 20.6 (CH<sub>3</sub>)

## 【0238】

(実測値: C, 68.7; H, 6.7; C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>の理論値 C, 68.8; H, 6.6%).

## 【0239】

## 実施例4

1-(2-O-アセチル-3-C-アリル-3,5-ジ-0-ベンジル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン (1)。

無水アセトニトリル(250 cm<sup>3</sup>)中のアノマー混合物OC ( $\beta : \alpha \sim 2:1$ , 11.8 g, 26.0 mmol) (P. Nielsen, H. M. Pfundheller および Wengel, Chem. Commun., 1997, 825; P. Nielsen, H. M. Pfundheller, C. E. Olsen および J. Wengel, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1997, 印刷中)およびチミン(6.55 g, 52.0 mmol)の攪拌溶液にN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(44.9 cm<sup>3</sup>, 182 mmol)を加えた。反応混合物を還流させながら1時間攪拌し、0°Cに冷却した。トリメ

チルシリルトリフレート(8.00 cm<sup>3</sup>, 44.0 mmol)を滴加し、溶液を室温で12時間攪拌した。氷で冷却した炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(270 cm<sup>3</sup>)を加え、混合物をジクロロメタン(3 × 125 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 125 cm<sup>3</sup>)およびブライン(2 × 125 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド1を得た(11.6 g, 86%)。

## 【0240】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.64 (1 H, br s, NH), 7.75 (1 H, d, J 1.1, 6-H), 7.41–7.25 (10 H, m, Bn), 6.43 (1 H, d, J 8.2, 1'-H), 5.88 (1 H, m, 2''-H), 5.66 (1 H, d, J 8.2, 2'-H), 5.12 (1 H, s, 3''-H<sub>a</sub>), 5.07 (1 H, dd, J 1.5, 8.5, 3''-H<sub>b</sub>), 4.85 (1 H, d, J 11.2, Bn), 4.64 (2 H, s, Bn), 4.63 (1 H, d, J 11.2, Bn), 4.33 (1 H, br s, 4'-H), 3.81 (1 H, dd, J 2.7, 11.1, 5'-H<sub>a</sub>), 3.65 (1 H, m, 5'-H<sub>b</sub>), 2.81–2.65 (2 H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 2.08 (3 H, s, COCH<sub>3</sub>), 1.52 (3 H, d, J 0.8, CH<sub>3</sub>).

## 【0241】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 170.1 (C=O), 163.6 (C-4), 150.9 (C-2), 138.1, 136.6 (Bn), 136.0 (C-6), 131.6 (C-2''), 128.8, 128.4, 128.3, 127.6, 127.5, 127.1 (Bn), 118.5 (C-3''), 111.1 (C-5), 84.2, 83.4, 83.1, 77.4 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73.6, 69.2 (Bn), 65.6 (C-5'), 33.7 (C-1''), 20.8 (COCH<sub>3</sub>), 11.9 (CH<sub>3</sub>)

## 【0242】

(実測値: C, 66.8; H, 6.3; N, 5.1. C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> の理論値 C, 66.9; H, 6.2; N, 5.4%).

## 【0243】

## 実施例5

1-(3-C-アリル-3,5-ジ-O-ベンジル- $\beta$ -D-リボフラノシル)チミン(2)。

メタノール(110 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド1(11.6 g, 22.3 mmol)の攪拌溶液にナトリウムメトキシド(3.03 g, 55.5 mmol)を加えた。反応混合物を室温で16時間

攪拌し、希塩酸で中和した。溶媒の一部を蒸発させて残渣をジクロロメタン(2 × 400 cm<sup>3</sup>)に溶解した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 250 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、白色固形物として2を得た(10.1 g, 95%)。

## 【0244】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.77 (1 H, br s, NH), 7.58 (1 H, d, J 1.2, 6-H), 7.41–7.25 (10 H, m, Bn), 6.14 (1 H, m, 2''-H), 6.12 (1 H, d, J 7.8, 1'-H), 5.23 (1 H, m, 3''-H<sub>a</sub>), 5.17 (1 H, br s, 3''-H<sub>b</sub>), 4.68 (1 H, d, J 10.8, Bn), 4.59 (2 H, s, Bn), 4.55 (1 H, d, J 10.9, Bn), 4.39 (1 H, br s, 4'-H), 4.26 (1 H, dd, J 7.8, 10.7, 2'-H), 3.84 (1 H, dd, J 3.1, 11.0, 5'-H<sub>a</sub>), 3.58 (1 H, dd, J 1.4, 11.0, 5'-H<sub>b</sub>), 3.04 (1 H, d, J 10.8, 2'-OH), 2.82–2.78 (2 H, m, 1''-Ha, 1''-H<sub>b</sub>), 1.51 (3 H, d, J 1.0, CH<sub>3</sub>).

## 【0245】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.5 (C-4), 151.1 (C-2), 137.3, 136.7 (Bn), 136.0 (C-6), 132.1 (C-2''), 128.8, 128.5, 128.3, 127.9, 127.6 (Bn), 118.4 (C-3''), 111.1 (C-5), 87.4, 82.6, 81.1, 79.3 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73.7, 69.8 (Bn), 64.7 (C-5'), 35.1 (C-1''), 11.9 (CH<sub>3</sub>).

## 【0246】

(実測値: C, 67.8; H, 6.1; N, 5.5. C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> の理論値 C, 67.8; H, 6.3; N, 5.9%).

## 【0247】

## 実施例6

1-(3-C-アリル-3,5-ジ-O-ベンジル-2-O-メタンスルホニル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(3)。

無水ピリジン(23 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド2 (3.50 g, 7.31 mmol)の攪拌溶液に塩化メタンスルホニル(1.69 cm<sup>3</sup>, 21.89 mmol)を0°Cで加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌し、水(100 cm<sup>3</sup>)を加え、ジクロロメタン(3 × 150 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 200 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1)を

溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体物として3を得た(3.64 g, 89%)。

### 【0248】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.95 (1 H, br s, NH), 7.71 (1 H, d, J 1.1, 6-H), 7.39–7.25 (10 H, m, Bn), 6.52 (1 H, d, J 8.0, 1'-H), 5.90 (1 H, m, 2''-H), 5.34 (1 H, d, J 7.9, 2'-H), 5.20–5.09 (2 H, m, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 4.91 (1 H, d, J 1.2, Bn), 4.68 (1 H, d, J 11.3, Bn), 4.64 (2 H, s, Bn), 4.33 (1 H, br s, 4'-H), 3.81 (1 H, dd, J 2.5, 11.1, 5'-Ha), 3.73 (1 H, dd, J 1.1, 11.1, 5'-H<sub>b</sub>), 3.08 (1 H, dd, J 5.5, 5.7, 1''-H<sub>a</sub>), 2.99 (3 H, s, CH<sub>3</sub>), 2.68 (1 H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.51 (3 H, d, J 0.8, CH<sub>3</sub>).

### 【0249】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 163.4 (C-4), 150.8 (C-2), 137.9, 136.3 (Bn), 135.5 (C-6), 131.0 (C-2''), 128.8, 128.3, 127.5, 127.2 (Bn), 119.3 (C-3''), 111.6 (C-5), 84.1, 83.6, 82.4, 82.2 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73.7, 68.9 (Bn), 66.2 (C-5'), 38.7 (CH<sub>3</sub>), 33.0 (C-1''), 11.9 (CH<sub>3</sub>)

### 【0250】

(実測値: C, 60.5; H, 5.8; N, 4.9.  $C_{18}H_{32}N_2O_8S$  の理論値 C, 60.4; H, 5.8; N, 5.0%).

### 【0251】

#### 実施例7

1-(3-C-アリル-3,5-ジ-O-ベンジル- $\beta$ -D-アラビノフラノシル)チミン(4)。

エタノール( $72 \text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド3(3.59 g, 6.45 mmol)溶液、水( $72 \text{ cm}^3$ )および1 M 水性水素化ナトリウム( $20.6 \text{ cm}^3$ )を還流させながら18時間攪拌した。希塩酸で中和した後、溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン( $3 \times 150 \text{ cm}^3$ )に溶解した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 200 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体物として4を得た(2.32 g, 74%)。

### 【0252】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 7.60 (1 H, d,  $J$  1.2, 6-H), 7.50–7.23 (10 H, m, Bn), 6.22 (1 H, d,  $J$  2.9, 1'-H), 5.80 (1H, m, 2''-H), 5.15–5.08 (2 H, m, 3''-H<sub>a</sub>, 3''-H<sub>b</sub>), 4.86–4.33 (6 H, m, 2 x Bn, 2'-H, 4'-H), 3.82–3.71 (2 H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 2.72 (1 H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 2.52 (1 H, dd,  $J$  7.6, 16.1, 1''-H<sub>b</sub>), 1.70 (3 H, d,  $J$  0.9, CH<sub>3</sub>).

## 【0253】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 165.1 (C-4), 150.4 (C-2), 138.4, 136.8 (Bn), 137.7 (C-6), 132.3 (C-2''), 128.77 128.4, 128.3, 128.0, 127.9, 127.6 (Bn), 118.5, (C-3''), 107.8 (C-5), 88.0, 87.8, 83.7 (C-1', C-3', C-4'), 73.7, 72.9, 69.4 (Bn, C-2'), 64.7 (C-5'), 31.1 (C-1''), 12.4 (CH<sub>3</sub>)

## 【0254】

(実測値: C, 67.5; H, 6.3; N, 5.3. C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>, 0.25H<sub>2</sub>O の理論値 C, 67.1; H, 6.4; N, 5.8%).

## 【0255】

## 実施例8

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-3-C-(2-ヒドロキシエチル)- $\beta$ -D-アラビノフラノシリル)チミン(5)。

THF(12 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド4(2.26 g, 4.68 mmol)および水(12 cm<sup>3</sup>)の攪拌溶液に過ヨウ素酸ナトリウム(3.04 g, 14.2 mmol)およびtert-ブタノール(w/w, 0.603 cm<sup>3</sup>, 40  $\mu$ mol)中2.5%四酸化オスミウム溶液を加えた。溶液を室温で45分間攪拌した。水(25 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液をジクロロメタン(2 x 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 x 30 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をTHF(12 cm<sup>3</sup>)および水(12 cm<sup>3</sup>)に再び溶解した。混合物を室温で攪拌し、水素化ホウ素ナトリウム(182 mg, 4.71 mmol)を加えた。1時間半攪拌した後、水(25 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液をジクロロメタン(2 x 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 x 30 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固形物として5を得た(1.13 g, 49%)。

## 【0256】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.29 (1 H, br s, NH), 7.47 (1 H, d, J 1.1, 6-H), 7.38-7.25 (10 H, m, Bn), 6.22 (1 H, d, J 3.4, 1'-H), 4.62 (2 H, s, Bn), 4.60 (1 H, m, 4'-H), 4.46 (2 H, s, Bn), 4.35 (1 H, dd, J 3.4, 7.5, 2'-H), 3.83-3.73 (4 H, m, 2 x 5'-H, 2 x 2''-H), 2.67 (1 H, br s, OH), 2.07-2.01 (2 H, m, 2 x 1''-H), 1.77 (3 H, d, J 0.5,  $\text{CH}_3$ ).

## 【0257】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.3 (C-4), 150.3 (C-2), 137.6, 137.4 (Bn, C-6), 136.7 (Bn), 128.6, 128.4, 128.2, 127.8, 127.6, 127.3, 127.1 (Bn), 108.4 (C-5), 88.0, 87.7, 81.6, 74.7 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73.7, 69.6 (Bn), 64.6 (C-5'), 57.7 (C-2''), 28.6 (C-1''), 12.4 ( $\text{CH}_3$ ).

## 【0258】

FAB-MS  $m/z$  483 [M+H] $^+$ , 505 [M+Na] $^+$

(実測値: C, 63.6; H, 6.2; N, 5.4.  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_7, 0.5\text{H}_2\text{O}$  の理論値 C, 63.5; H 6.4; N, 5.7%).

## 【0259】

## 実施例9

(1S,5R,6R,8R)-5-ヒドロキシ-6-(ヒドロキシメチル)-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(6)。

無水ピリジン( $5.0 \text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド5(1.08 g, 2.20 mmol)溶液を0°Cで攪拌し、無水ピリジン( $2.0 \text{ cm}^3$ )中の塩化p-トルエンスルホニル(462 mg, 2.47 mmol)溶液を滴加した。室温で20時間攪拌し、水と水の混合物( $70 \text{ cm}^3$ )を加えた後、ジクロロメタン( $2 \times 75 \text{ cm}^3$ )で抽出した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 50 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、中間生成物を得、それを蒸発させた後無水DMF( $4.0 \text{ cm}^3$ )に溶解した。溶液を無水DMF( $4.0 \text{ cm}^3$ )中60% 水素化ナトリウム(203 mg, 4.94 mmol)の攪拌懸濁液に0°Cで滴加した。混合物を18時間攪拌し、水( $20 \text{ cm}^3$ )を加えた。塩酸で中和した後、ジクロロメタン( $75 \text{ cm}^3$ )を加えた。有機相を炭酸水素ナト

リウム飽和水溶液( $3 \times 50 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体を得た(858 mg)。エタノール(10.0  $\text{cm}^3$ )中のこの白色固体の溶液(846 mg, 1.80 mmol)を室温で攪拌し、炭素上の水酸化パラジウム(400 mg)を20%で加えた。混合物をアルゴンで脱ガスし、水素雰囲気下に置いた。2時間混合した後、混合物をジクロロメタン/メタノール(97:3, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで直接精製し、白色固体として6を得た(444 mg, 82%)。

## 【0260】

$\delta_{\text{H}}$  ( $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ) 11.3 (1 H, br s, NH), 7.36 (1 H, d,  $J$  1.1, 6-H), 5.80 (1 H, d,  $J$  4.3, 1'-H), 5.61 (1 H, s, OH), 4.86 (1 H, m, 5'-H<sub>a</sub>), 3.89 (1 H, d,  $J$  4.2, 2'-H), 3.85 (1 H, m, 2''-H<sub>a</sub>), 3.83-3.64 (3 H, m, 4'-H, 5'-H<sub>b</sub>, 2''-H<sub>b</sub>), 2.14 (1 H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 1.81 (1 H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.78 (3 H, d,  $J$  1.0, CH<sub>3</sub>).

## 【0261】

$\delta_{\text{C}}$  ( $(\text{CD}_3\text{OD})$ ) 166.7 (C-4), 152.2 (C-2), 139.7 (C-6), 110.1 (C-5), 89.4, 89.1, 85.5, 85.2 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 71.4 (C-2''), 61.6 (C-5''), 37.0 (C-1''), 12.7 (CH<sub>3</sub>)

## 【0262】

(実測値: C, 47.4; H, 5.7; N, 9.0.  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{,H}_2\text{O}$  の理論値C, 47.7; H, 6.0; N, 9.3%).

## 【0263】

## 実施例10

(1S,5R,6R,8R)-6-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-5-ヒドロキシ-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]ノナン(7)。

無水ピリジン( $2.5 \text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド6(310 mg, 1.09 mmol)溶液を室温で攪拌し、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(593 mg, 1.83 mmol)を加えた。3時間攪拌した後、さらに4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(100 mg, 0.310 mmol)を加えた。さらに2時間攪拌した後、メタノール( $0.5 \text{ cm}^3$ )を加え、混合物を

蒸発させた。残渣をジクロロメタン(5 cm<sup>3</sup>)に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 5 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として7を得た(618 mg, 97%)。

#### 【0264】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 9.04 (1 H, br s, NH), 7.47–7.16 (10 H, m, 6–H, DMT), 6.86–6.82 (4 H, m, DMT), 6.06 (1 H, d, J 4.1, 1'-H), 4.35 (1 H, d, J 4.1, 2'-H), 4.03 (1 H, m, 4'-H), 3.89 (1 H, m, 2''-H<sub>a</sub>), 3.79 (6 H, s, 2 × OCH<sub>3</sub>), 3.61 (1 H, m, 5'-Ha), 3.32–3.26 (2 H, m, 5'-H<sub>b</sub>, 2''-H<sub>b</sub>), 1.94–1.69 (2 H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 1.89 (3 H, s, CH<sub>3</sub>).

#### 【0265】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.4 (C-4), 158.6 (DMT), 150.1 (C-2), 144.3 (DMT), 137.2 (C-6), 135.6, 135.3, 129.9, 129.9, 128.9, 128.1, 127.9, 126.9, 125.2, 113.2 (DMT), 109.3 (C-5), 88.7, 87.3, 86.9, 83.5, 81.0 (DMT, C-1', C-2', C-3', C-4'), 69.7 (C-2''), 62.1 (C-5'), 55.1 (OCH<sub>3</sub>), 36.5 (C-1''), 12.5 (CH<sub>3</sub>).

#### 【0266】

#### 実施例11

(1S,5R,6R,8R)-5-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノシ)-6-(4,4'-ジメトキシトリルオキシメチル)-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]ノナン(8)。

無水ジクロロメタン(2.2 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド7(436 mg, 0.743 mmol)溶液およびジイソプロピルエチルアミン(0.62 cm<sup>3</sup>)を室温で攪拌し、2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.33 cm<sup>3</sup>, 1.46 mmol)を加えた。1時間半攪拌した後、メタノール(0.4 cm<sup>3</sup>)および酢酸エチル(5 cm<sup>3</sup>)を加え、混合物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 5 cm<sup>3</sup>)およびブライン(3 × 5 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/トリエチルアミン(97:3, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製した。溶媒を蒸発させ、油を得、これをトルエン(1 cm<sup>3</sup>)中に溶解させ

た。これをヘキサンから-30°Cで析出させ、白色固体物質として8を得た(517 mg, 88%)。

### 【0267】

$\delta_p$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 142.0, 141.9.

### 【0268】

#### 実施例12

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-3-C-(2-ヒドロキシエチル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(9)。

THF(5.4 cm<sup>3</sup>)および水(5.4 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド2(1.00 g, 2.09 mmol)の攪拌溶液に過ヨウ素酸ナトリウム(1.34 g, 6.27 mmol)およびtert-ブタノール(w/w, 0.265 cm<sup>3</sup>, 19  $\mu\text{mol}$ )中の四酸化オスミウム2.5%溶液を加えた。溶液を室温で45分間攪拌した。水(25 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液をジクロロメタン(2 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 30 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をTHF(5.4 cm<sup>3</sup>)および水(5.4 cm<sup>3</sup>)に再び溶解した。混合物を室温で攪拌し、水素化ホウ素ナトリウム(79 mg, 2.08 mmol)を加えた。1時間半攪拌した後、水(25 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液をジクロロメタン(2 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相を炭酸水素飽和水溶液(3 × 30 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体物としてヌクレオシド9を得た(488 mg, 48%)。

### 【0269】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.14 (1 H, br s, NH), 7.60 (1 H, d, J 1.1, 6-H), 7.40–7.22 (10 H, m, Bn), 6.25 (1 H, d, J 7.7, 1'-H), 4.59 (1 H, d, J 7.1 Bn), 4.49 (1 H, d, J 7.1 Bn), 4.39–3.30 (m, 8H, 4'-H, 2'-H, Bn, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 2'-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>), 2.23–2.00 (2 H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 1.49 (3 H, d, J 0.7, CH<sub>3</sub>).

### 【0270】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 163.5 (C-4), 151.2 (C-2), 137.1, 136.5 (Bn), 135.7 (C-6), 128.7, 128.5, 128.2, 127.8, 127.6, 127.2 (Bn), 111.3 (C-5), 87.0, 82.7, 81

.1, 78.3 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73.7, 69.6 (Bn), 64.4 (C-5'), 57.0 (C-2''), 32.4 (C-1''), 11.8 (CH<sub>3</sub>)

### 【0271】

(実測値: C, 63.9; H, 6.3; N, 5.4. C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 0.25H<sub>2</sub>O の理論値 C, 64.1; H 6.3; N, 5.75%).

### 【0272】

#### 実施例13

1-[3-C-(2-O-t-ブチルジメチルシリルオキシエチル)-3,5-ジ-O-ベンジル-β-D-リボフラノシリル]チミン(10)。

ヌクレオシド9(1.80 g, 3.4 mmol)およびt-ブチルジメチルシリルクロライド(0.585 g, 3.9 mmol)の混合物を無水ピリジン(20 cm<sup>3</sup>)に溶解した。室温で2時間後、反応混合物をトルエン(2 × 10 cm<sup>3</sup>)と共に乾燥するまで2回蒸発させ、ジクロロメタン(150 cm<sup>3</sup>)に再び溶解した。溶液を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 50 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、蒸発させて発泡体を得た。この物質を勾配溶出液(ジクロロメタン中0-3%メタノール、v/v)を用いた分取シリカゲルHPLCで精製し、白色固体としてヌクレオシド10を得た(1.86 g, 92%)。

### 【0273】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.61 (1H, d, J 1.1, 6-H), 7.35-7.20 (10H, m, Bn), 6.27 (1H, d, J 7.9, 1'-H), 4.65-4.40 (4H, m, Bn, 2'-H), 4.37 (1H, s, Bn), 4.28 (1H, t, J 7.9, 4'-H), 4.35 - 3.55 (4H, m, 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 2.30-2.05 (2H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 1.46 (3H, s, 5-CH<sub>3</sub>), 0.90 (9H, m, CH<sub>3</sub>-C-Si), 0.08 (6H, m, CH<sub>3</sub>-Si).

### 【0274】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.6 (C-6), 151.0 (C-2), 137.5, 136.6, 135.8 (C-5, Bn), 128.3, 128.1, 127.8, 127.2, 127.1, 126.8, 126.7 (Bn), 110.7 (C-4), 86.8, 82.5, 81.6, 78.3 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 73.3, 69.8 (Bn), 64.46 (C-5'), 58.2 (C-2''), 32.9 (C-1''), 25.6, 25.4, 17.9, -3.9, -5.7 (TBDMS), 11.6 (CH<sub>3</sub>).

### 【0275】

FAB<sup>+</sup>-MS: m/z 597.19 [M+H]<sup>+</sup>, 619.18 [M+Na]<sup>+</sup>

(実測値: C, 64.2; H, 7.4; N, 4.2; C<sub>32</sub>H<sub>44</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Siの理論値 C, 64.4; H, 7.4; N, 4.7%).

### 【0276】

#### 実施例14

1-[3-C-(2-t-ブチルジメチルシリルオキシエチル)-3,5-ジ-O-ベンジル-β-D-エリスロ-ペントフラン-2-ウロシル]チミン(11)。

ヌクレオシド10(2.14 g, 3.59 mmol), 1.48 g (3.95 mmol)の2クロム酸ピリジニウム(1.48 g, 3.95)および活性化3Aモレキュラーシーブ粉末(4g)の混合物を無水ジクロロメタン(80 cm<sup>3</sup>)に懸濁した。混合物を-10°Cに冷却した後、激しく攪拌しながら無水酢酸(10 cm<sup>3</sup>, 98 mmol)を滴加した。懸濁液を室温まで温め、1時間半攪拌を続け、トリエチルアミン(20 cm<sup>3</sup>)を加えることにより反応を停止した。混合物をジクロロメタンで300 cm<sup>3</sup>まで希釈し、水(2 × 200 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を蒸発させ、残渣をジクロロメタン(v/v, それぞれ全容量250 cm<sup>3</sup>)中の1.0, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5%メタノールの勾配を使用したフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド11(1.89 g, 84.4%)を得た。

### 【0277】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.35-7.20 (11H, m, Bn, 6-H), 6.40 (1H, s, 1'-H), 4.57 (1H, s, Bn), 4.52 (1H, s, Bn), 4.46 (1H, d, J 11.0, Bn), 4.29 (1H, d, J 11.0, Bn), 4.07 (1H, dd, J' 0.5, 2.2, 4'-H), 3.95-3.70 (4H, m, 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 2.05 (1H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 2.42 (1H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.42 (3H, d, J 1.1, 5-CH<sub>3</sub>), 0.86 (9H, s, CH<sub>3</sub>-C-Si), 0.01 (6H, s, CH<sub>3</sub>-Si).

### 【0278】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 202.6 (C-2'), 163.7 (C-4), 151.2 (C-2), 137.7, 136.6, 136.5 (Bn, C-6), 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.7, 126.4, 126.3 (Bn), 110.9 (C-5), 84.5, 81.3, 80.2 (C-1', C-3', C-4'), 73.6, 70.4 (Bn), 66.0 (C-5'), 57.6 (C-2''), 27.3 (C-1''), 25.9, 25.7, 18.2, -5.8, -5.9 (TBDMS), 11.7 (CH<sub>3</sub>).

## 【0279】

FAB-MS  $m/z$  595.14 [M+H]<sup>+</sup>

(実測値: C, 64.1; H, 6.9; N, 4.5; C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Si の理論値C, 64.6; H, 7.1; N, 4.7%).

## 【0280】

## 実施例15

(1S,5R,6R,8R)-1-ヒドロキシ-5-ベンジルオキシ-6-ベンジルオキシメチル-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(12)。

化合物11 (1.80 g, 30.3 mmol)をメタノール(w/w, 20 cm<sup>3</sup>)中の0.5% HClに溶解し、混合物を室温で30分間攪拌した。蒸発乾固させた後、残渣をジクロロメタン(100 cm<sup>3</sup>)に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 40 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を蒸発させ、残渣をジクロロメタン(v/v)中の2%メタノールで溶出させたフラッシュシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド12(1.35 g, 93.5%)を得た。

## 【0281】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.37–7.27 (1H, m, Bn, 6-H), 5.87 (1H, s, 1'-H), 4.71 (2H, s, Bn), 4.64 (1H, d, J 12.0, Bn), 4.56 (1H, d, J 12.0, Bn), 4.36 (1H, t, J 5.7, 4'-H), 4.16 (1H, m, 2''-H<sub>a</sub>), 3.96 (1H, m, 2''-H<sub>b</sub>), 3.74 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 2.35–2.15 (2H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 1.88 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0282】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.7 (C-4), 151.4 (C-2), 137.8, 137.3, 136.7 (Bn, C-6), 128.5, 128.4, 128.0, 127.8, 127.5 (Bn), 109.9 (C-5), 108.6 (C-2'), 88.8, 87.1, 80.9 (C-1', C-3', C-4'), 73.6, 68.5, 68.1, 67.9 (C-5', C-2'', Bn), 30.9 (C-1''), 12.6 (CH<sub>3</sub>).

## 【0283】

FAB-MS:  $m/z$  481.03 [M+H]<sup>+</sup>, 503.02 [M+Na]<sup>+</sup>

(実測値: C, 64.6; H, 5.8; N, 5.7; C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> の理論値 C, 65.0; H, 5.9; N, 5.8%).

## 【0284】

## 実施例16

(1S,5R,6R,8R)-1,5-ジヒドロキシ-6-ヒドロキシメチル-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(13)。

6の合成と同様の方法でベンジル保護基を触媒的に除去することにより、化合物13を化合物12から連続的に誘導した。13の精製をジクロロメタン中のメタノールの勾配濃度(6~14%)で溶出させながらカラムシリカゲルクロマトグラフィで行った。分析量の化合物13(15 mgまで)をスクリオシリC18( $10 \mu\text{m}$ )を充填したカラム( $10 \times 250 \text{ mm}$ )で逆相HPLCにより追加的に精製した。流量:8  $\text{cm}^3/\text{分}$ ; 溶出液:0~10%アセトニトリル、60分間。 収率82%.

## 【0285】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7.44 (1H, d,  $J$  1.2, 6-H), 5.83 (1H, s, 1'-H), 4.10~3.80 (5H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>, 4'-H), 2.39~2.25 (1H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 2.00~1.90 (1H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.87 (3H, d,  $J$  1.2, CH<sub>3</sub>).

## 【0286】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 166.3 (C-4), 152.7 (C-2), 139.8 (C-6), 110.0, 109.6 (C-2', C-5), 87.8, 85.8, 84.6 (C-1', C-3', C-4'), 68.8, 61.6 (C-5', C-2''), 35.6 (C-1''), 12.4 (CH<sub>3</sub>).

## 【0287】

FAB-MS: m/z 301.03 [M+H]<sup>+</sup>

(実測値: C, 46.6; H, 5.7; N, 8.5; C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> の理論値 C, 48.0; H, 5.4; N, 9.3%).

## 【0288】

## 実施例17

(1S,5R,6R,8R)-5-ベンジルオキシ-6-ベンジルオキシメチル-1-メトキシ-8-(3-N-メチルチミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(14)、(1S,5R,6R,8R)-5-ベンジルオキシ-6-ベンジルオキシメチル-1-ヒドロキシ-8-(3-N-メチルチミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(15)および(1S,5R,6R,8R)-5-ベンジルオキシ-6-ベンジルオキシメチル-1-メトキシ-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(16)。

化合物12(1.04 g, 2.16 mmol)と水素化ナトリウム(鉱油中60%懸濁液、171 mg、4.30 mmol)の混合物を攪拌しながら無水ジクロロメタン(4 cm<sup>3</sup>)に10分間溶解した。ヨウ化メチル(1 cm<sup>3</sup>, 16 mmol)を加え、反応混合物を36°Cで23時間インキュベートした。蒸発後、残渣をジクロロメタン(v/v)中0.4–2.4%メタノールの勾配で溶出させながらシリカゲルクロマトグラフィで精製し、生成物14、15および16ならびに出発材料12(212 mg, 20.5%)を得た。

### 【0289】

化合物14(47 mg, 4.3%)。

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.25–7.37 (1H, m, Bn, 6-H), 6.15 (1H, s, 1'-H), 4.74 (1H, d, J 11.5, Bn), 4.67 (1H, d, J 11.3, Bn), 4.62 (1H, d, J 12.1, Bn), 4.55 (1H, d, J 11.9, Bn), 4.34 (1H, t, J 5.6, 4'-H), 3.99, (1H, m, 2''-H<sub>a</sub>), 4.22 (1H, m, 2''-H<sub>b</sub>), 3.72 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 3.41 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 3.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>-N<sub>3</sub>), 2.27 (1H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 2.41 (1H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.93 (3H, s, 5-CH<sub>3</sub>).

### 【0290】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.3 (C-4), 151.0 (C-2), 138.2, 137.3, 135.7 (Bn, C-6), 128.3, 128.2, 127.8, 127.6, 127.4, 126.9 (Bn), 111.8 (C-5), 108.5 (C-2'), 89.1, 84.8, 79.5 (C-1', C-3', C-4'), 73.5, 68.4, 68.2, 67.3 (Bn, C-5', C-2''), 50.8 (CH<sub>3</sub>-O), 32.6 (C-1''), 27.9 (CH<sub>3</sub>-N), 13.2 (CH<sub>3</sub>).

### 【0291】

FAB-MS: m/z 508.88 [M+H]<sup>+</sup>

(実測値: C, 65.7; H, 6.9; N, 4.8; C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> の理論値 C, 66.1; H, 6.3; N, 5.5%)。

### 【0292】

化合物15 (97 mg, 9.1%)。

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.37–7.28 (1H, m, Bn, 6-H), 5.86 (1H, s, 1'-H), 4.72 (2H, s, Bn), 4.64 (1H, d, J 11.9, Bn), 4.58 (1H, d, J 11.9, Bn), 4.37 (1H, t, J 5.6, 4'-H), 4.13 (1H, m, 2''-H<sub>a</sub>), 3.93 (1H, m, 2''-H<sub>b</sub>), 3.75 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 3.34 (1H, s, CH<sub>3</sub>-N), 2.32–2.16 (2H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 1.

93 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

【0293】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.2 (C-4), 151.9 (C-2), 137.5, 137.1, 134.0 (Bn, C-6), 128.4, 128.3, 128.1, 127.9 127.7, 127.6, 127.3 (Bn), 108.8, 108.5 (C-2', C-5), 88.7 (C-1'), 88.0, 81.0 (C-3', C-4'), 73.5, 68.3, 67.9, 67.7 (Bn, C-5', C-2''), 30.6 (C-1''), 27.8 (CH<sub>3</sub>-N), 13.2 (CH<sub>3</sub>).

【0294】

FAB-MS m/z 495.28 [M+H]<sup>+</sup>, 517.24 [M+Na]<sup>+</sup>。

【0295】

化合物16(665 mg, 62.3%)。

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.35–7.25 (11H, m, Bn, 6-H), 6.06 (1H, s, 1'-H), 4.73 (1H, d, J 11.5, Bn), 4.66 (1H, d, J 11.3, Bn), 4.61 (1H, d, J 11.9, Bn), 4.55 (1H, d, J 12.0, Bn), 4.34 (1H, t, J 5.6, 4'-H), 4.20 (1H, m, 2''-H<sub>b</sub>), 3.98 (1H, m, 2''-H<sub>a</sub>), 3.72 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 3.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 2.45–2.35 (1H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 2.30–2.20 (1H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.90 (3H, d, J 1.1, C-H<sub>b</sub>).

【0296】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.2 (C-4), 150.1 (C-2), 138.2, 137.9, 137.3 (Bn, C-6), 128.4, 128.2, 127.8, 127.6 127.4, 127.1 (Bn), 110.8 (C-5), 109.3 (C-2'), 89.2, 84.2, 79.6 (C-1', C-3', C-4'), 73.6, 68.5, 68.3, 67.4 (Bn, C-5', C-2''), 50.8 (CH<sub>3</sub>-O), 32.6 (C-1''), 12.5 (CH<sub>3</sub>).

【0297】

FAB-MS m/z 495.22 [M+H]<sup>+</sup>, 517.23 [M+Na]<sup>+</sup>

(実測値: C, 66.2; H, 7.2; N, 4.4; C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub> の理論値 C, 65.6; H, 6.1; N, 5.7%).

【0298】

実施例18

(1S,5R,6R,8R)-5-ヒドロキシ-6-ヒドロキシメチル-1-メトキシ-8-(チミン-1-イ  
ル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(17)。

メタノール(10cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド16(1.20 g, 2.43 mmol)溶液に木炭上の20%水酸化パラジウム(250 mg)を加え、混合物を減圧下で注意深く脱気した。水素雰囲気を利用して攪拌を12時間続けた。反応混合物をメタノール中のシリカゲルを充填したガラスカラム(1 × 8 cm)で濾過することにより触媒を除去した。カラムをメタノール(20 cm<sup>3</sup>)でさらに洗浄した。全ての画分を回収し、蒸発乾固させて石油エーテルと共に蒸発させ、ガラス状の固体を得た。この残渣をジクロロメタン(v/v)中の5-10%メタノール勾配で溶出させながらシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製した。生成物を含有する画分を回収し、合わせて蒸発乾固させた。残渣を無水メタノール(5 cm<sup>3</sup>)に溶解し、無水ベンゼン(100 cm<sup>3</sup>)を加えた。凍結乾燥により白色固体としてヌクレオシド17を得た(0.61 g, 79%)。

## 【0299】

$\delta_{\text{H}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 7.45 (1H, s, 6-H), 5.93 (1H, s, 1'-H), 4.15-3.81 (5H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>, 4'-H), 3.43 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 2.47-2.40 (1H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 2.03-1.93 (1H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.92 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0300】

$\delta_{\text{C}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 164.1 (C-4), 150.1 (C-2), 138.3 (C-6), 109.6 (C-5), 108.3 (C-2'), 84.4, 84.1, 82.4 (C-1', C-3', C-4'), 68.0, 59.5 (C-5', C-2''), 49.6 (CH<sub>3</sub>-O), 34.0 (C-1''), 10.5 (CH<sub>3</sub>).

## 【0301】

FAB-MS m/z 315.13 [M+H]<sup>+</sup>, 337.09 [M+Na]<sup>+</sup>

(実測値: C, 49.9; H, 5.7; N, 8.2; C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>O<sub>7</sub>N<sub>2</sub> の理論値 C, 49.7; H, 5.8; N, 8.9%)。

## 【0302】

## 実施例19

(1S,5R,6R,8R)-6-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-5-ヒドロキシ-1-メトキシ-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(18)。

化合物17(0.95 g, 3.03 mmol)と4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(1.54 g, 4.77 mmol)の混合物を無水ピリジン(20 cm<sup>3</sup>)に溶解し、室温で4時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、油状の残渣を得た。これをトルエン(2 × 20 cm<sup>3</sup>)と共に

蒸発させた。ジクロロメタン(50 cm<sup>3</sup>)および炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(50 cm<sup>3</sup>)を加え、有機相を分離して蒸発させ、残渣をシリカゲルHPLCで精製した(残渣は0.5%トリエチルアミン(v/v)を含む最少量のジクロロメタンに溶解し、同一の溶媒で平衡させたカラムに付した)。カラムを洗浄し(酢酸エチル:石油エーテル:トリエチルアミン; 15:84.5:0.5 (v/v/v, 1000 cm<sup>3</sup>), 生成物を0.5%トリエチルアミン(v/v/v)を含むジクロロメタン中のメタノール勾配(0-2%)で溶出し、白色固体として化合物18(1.71 g, 92.8%)を得た。

## 【0303】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.51-7.17 (10H, m, DMT, 6-H), 6.79-6.85 (4H, m, DMT), 6.04 (1H, s, 1'-H), 4.12-3.98 (3H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 4'-H), 3.77 (6H, s, CH<sub>3</sub>-DMT), 3.49 (3H, s, CH<sub>3</sub>-O), 3.45-3.32 (2H, m, 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>), 2.11-2.01 (1H, m, 1''-H<sub>a</sub>), 1.94-1.87 (1H, m, 1''-H<sub>b</sub>), 1.93 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0304】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 164.2 (C-4), 158.6, 144.7, 135.7, 130.1, 128.2, 127.9, 126.8, 113.2 (DMT), 150.7 (C-2), 137.7 (C-6), 109.8, 109.7 (C-5, C-2'), 86.5, 85.3, 85.0, 81.4 (DMT, C-1', C-3', C-4'), 69.2, 62.4 (C-5', C-2''), 55.2 (CH<sub>3</sub>-DMT), 51.7 (CH<sub>3</sub>-O), 35.5 (C-1''), 12.7 (CH3).

## 【0305】

FAB-MS m/z 617.26 [M+H]<sup>+</sup>, 639.23 [M+Na]<sup>+</sup>

(実測値: C, 66.4; H, 6.1; N, 4.2; C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>O<sub>9</sub>N<sub>2</sub> の理論値 C, 66.2; H, 5.9; N, 4.5%).

## 【0306】

## 実施例20

(1S,5R,6R,8R)-5-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-6-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-1-メトキシ-8-(チミン-1-イル)-2,7-ジオキサビシクロ[3.3.0]オクタン(19)。

化合物18(1.2 g, 1.95 mmol)を無水ジクロロメタン(10 cm<sup>3</sup>)に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(1.35 cm<sup>3</sup>, 7.8 mmol)および2-シアノエチル-N,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.92 g, 3.9 mmol)を室温で攪拌し

ながら加えた。72時間後、混合物をジクロロメタンで100 cm<sup>3</sup>に希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(50 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を蒸発させ、溶出液A(石油エーテル:ジクロロメタン:ピリジン; 50:50:0.5; v/v/v)中の溶出液B(石油エーテル:ジクロロメタン:酢酸エチル:ピリジン; 45:45:10:0.5; v/v/v)の勾配を用いたシリカゲルHPLCに付した。生成物を含む画分を濃縮し、トルエン(10 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させ、減圧下で乾燥した。残渣を無水ベンゼン(20 cm<sup>3</sup>)に溶解し、この溶液を無水石油エーテル(400 cm<sup>3</sup>)に攪拌しながら加えることによって析出した。得られた白色固体を濾過して分離し、乾燥して化合物19(0.96 g, 60.3%)を得た。

## 【0307】

$\delta_p$  (CDCl<sub>3</sub>) 142.64, 142.52.

## 【0308】

FAB-MS m/z 817.26 [M+H]<sup>+</sup>, 839.24 [M+Na]<sup>+</sup>

(実測値: C, 62.8; H, 6.4; N, 6.9; C<sub>43</sub>H<sub>53</sub>O<sub>10</sub>N<sub>4</sub>P の理論値C, 63.2; H, 6.5; N, 6.9%).

## 【0309】

## 実施例21

1,2-O-イソプロピリデン-3-C-ビニル- $\alpha$ -D-リボフラノース(20)。

無水THF(250 cm<sup>3</sup>)中の5-O-t-ブチルジメチルシリル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-エリスロ-ペント-3-ウロフラノース(Y. Yoshimura, T. Sano, A. Matsuda, T. Ueda, Chem. Pharm. Bull., 1988, 36, 162) (6.05 g, 0.020 mol)溶液を0°Cで攪拌し、エーテル(44 cm<sup>3</sup>, 44 mmol)中のビニルマグネシウムプロマイド1 M溶液を滴加した。反応混合物を室温で2時間攪拌し、そこに飽和水性塩化アンモニウム(200 cm<sup>3</sup>)を加え、ジクロロメタン(3 × 300 cm<sup>3</sup>)を用いて抽出した。合わせた抽出物をブライン(3 × 250 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を除去し、残渣を無水THF(225 cm<sup>3</sup>)に再溶解した。この混合物にTHF(22 cm<sup>3</sup>, 22 mmol)中のテトラブチルアンモニウムフルオライド1 M溶液を加え、室温で20分間攪拌し、混合物を減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン(500 cm<sup>3</sup>)に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 200 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。12時間の継続抽出に

よって水相を抽出し、合わせた抽出物を乾燥し( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてフラノース20を得た(3.24 g, 75%)。

### 【0310】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 5.84 (1H, d,  $J$  3.7, 1-H), 5.74 (1H, dd,  $J$  11.0, 17.2, 1'-H), 5.52 (1H, dd,  $J$  1.6, 17.1, 2'-H<sub>a</sub>), 5.29 (1H, dd,  $J$  1.3, 11.0, 2'-H<sub>b</sub>), 4.21 (1H, d,  $J$  3.7, 2-H), 3.98 (1H, t,  $J$  5.7, 4-H), 3.68–3.64 (2H, m, 5-H<sub>a</sub>, 5-H<sub>b</sub>), 2.88 (1H, s, 3-OH), 1.99 (1H, t,  $J$  6.3, 5-OH), 1.60 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.35 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

### 【0311】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 133.6 (C-1'), 116.2 (C-2'), 113.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 103.8 (C-1), 83.4, 82.4 (C-4, C-2), 79.6 (C-3), 61.3 (C-5), 26.5, 26.4 (CH<sub>3</sub>).

### 【0312】

#### 実施例22

3,5-ジ-0-ベンジル-1,2-0-イソプロピリデン-3-C-ビニル- $\alpha$ -D-リボフラノース(21)。

無水DMF(50 cm<sup>3</sup>)中の60%水素化ナトリウム懸濁液(w/w, 1.78 g, 44.5 mmol)を0°Cで攪拌し、無水DMF(35 cm<sup>3</sup>)中のフラノース20(3.20 g, 14.8 mmol)の溶液を30分間かけて滴加した。混合物を50°Cで1時間攪拌し、次いで0°Cに冷却した。無水DMF(5.3 cm<sup>3</sup>)中の臭化ベンジル溶液(5.3 mL, 44.5 mmol)を滴加し、混合物を室温で20時間攪拌した。反応混合物を蒸発させ、ジクロロメタン(300 cm<sup>3</sup>)に再び溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 200 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣を石油エーテル/酢酸エチル(9:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてフラノース21を得た(5.36 g, 91%)。

### 【0313】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 7.40–7.26 (10H, m, Bn), 5.90 (1H, d,  $J$  3.6, 1-H), 5.72 (1H, dd,  $J$  11.1, 17.9, 1'-H), 5.41 (1H, dd,  $J$  0.7, 11.1, 2'-H<sub>a</sub>), 5.30 (1H, dd,  $J$  0.5, 17.8, 2'-H<sub>b</sub>), 4.70–4.45 (6H, m, Bn, 2-H, 4-H), 3.69 (1H, dd,  $J$

2.6, 10.8, 5-Ha), 3.50 (1H, dd, J 7.9, 10.9, 5-H<sub>b</sub>), 1.64 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0314】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 138.6, 138.3 (Bn), 134.5 (C-1'), 128.3-127.4 (Bn), 118.2 (C-2'), 112.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 104.7 (C-1), 84.7, 81.1, 81.0 (C-2, C-3, C-4), 73.3 (C-5), 69.4, 67.0 (Bn), 26.8, 26.6 (CH<sub>3</sub>).

## 【0315】

## 実施例23

1,2-ジ-0-アセチル-3,5-ジ-0-ベンジル-3-C-ビニル- $\alpha$ , $\beta$ -D-リボフラノース(22)。

80% 水性酢酸(50 cm<sup>3</sup>)中のフラノース21溶液(4.40 g, 11.1 mmol)を90°Cで8時間攪拌した。溶媒を除去し、残渣を99%エタノール(3 × 25 cm<sup>3</sup>)、トルエン(3 × 25 cm<sup>3</sup>)および無水ピリジン(2 × 25 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させ、無水ピリジン(20 cm<sup>3</sup>)に再び溶解した。無水酢酸(17 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液を室温で48時間攪拌した。反応混合物を氷冷水(100 cm<sup>3</sup>)で失活させ、ジクロロメタン(2 × 100 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 100 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を蒸発し、残渣を石油エーテル/酢酸エチル(4:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、油としてフラノース22を得た(4.27 g, 87%,  $\alpha$ : $\beta$  ~ 1:1)。

## 【0316】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 169.9, 169.8 (C=O), 139.0, 138.6, 138.0, 137.8 (Bn), 133.3, 132.4 (C-1'), 128.4-126.8 (Bn), 119.6, 119.5 (C-2'), 99.5, 94.0 (C-1), 85.4, 85.0, 84.3, 83.6, 77.7, 73.6, 73.5, 73.3, 70.0, 69.2, 67.5, 67.2 (C-2, C-3, C-4, C-5, Bn), 21.0, 20.9, 20.6, 20.4 (CH<sub>3</sub>).

## 【0317】

## 実施例24

1-(2-O-アセチル-3,5-ジ-0-ベンジル-3-C-ビニル- $\beta$ -D-リボフラノシル)チミン(23)。

無水アセトニトリル(100 cm<sup>3</sup>)中の化合物22(4.24 g, 9.6 mmol)およびチミン(

2.43 g, 19.3 mmol)の攪拌溶液にN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(11.9 cm<sup>3</sup>, 48.1 mmol)を加えた。反応混合物を還流させながら30分間攪拌した。0℃に冷却した後、トリメチルシリルトリフラーート(3.2 cm<sup>3</sup>, 16.4 mmol)を滴加し、溶液を室温で24時間攪拌した。反応を冷たい炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(100 cm<sup>3</sup>)で失活させ、得られた混合物をジクロロメタン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 50 cm<sup>3</sup>)およびブライン(2 × 50 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。抽出物を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色発泡体としてヌクレオシド23を得た(4.03 g, 83%)。

## 【0318】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.78 (1H, br s, NH), 7.75 (1H, s, 6-H), 7.38–7.26 (10 H, m, Bn), 6.49 (1H, d, J 8.1, 1'-H), 5.99–5.88 (2H, m, 2'-H and 1''-H), 5.54–5.48 (2H, m, 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>), 4.91–4.50 (4H, m, Bn), 4.34 (1H, s, 4'-H), 3.80 (1H, m, 5'-H<sub>a</sub>), 3.54 (1H, m, 5'-H<sub>b</sub>), 2.11 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0319】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 170.1 (C=O), 163.8 (C-4), 151.0 (C-2), 138.9, 136.9 (Bn), 136.1 (C-6), 132.0 (C-1''), 128.7, 128.5, 128.2, 127.8, 127.7, 127.5, 127.5, 127.1 (Bn), 120.7 (C-2''), 111.3 (C-5), 85.4 (C-1'), 85.2 (C-3'), 84.3 (C-4'), 76.0 (C-2'), 73.7 (C-5'), 69.3, 67.6 (Bn), 20.6 (COCH<sub>3</sub>), 11.7 (CH<sub>3</sub>).

## 【0320】

実測値: C, 66.3; H, 6.0; N, 5.1; C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> の理論値 C, 66.4; H, 6.0; N, 5.5%。

## 【0321】

## 実施例25

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-3-C-ビニル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(24)。

無水メタノール(40 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド23(3.90 g, 7.7 mmol)の攪拌溶液にナトリウムメトキシド(0.83 g, 15.4 mmol)を加えた。混合物を室温で42時間攪

拌し、希塩酸水で中和した。混合物をジクロロメタン( $2 \times 150 \text{ cm}^3$ )で抽出し、合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 100 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、白色発泡体としてヌクレオシド24を得た(3.48 g, 97%)。

## 【0322】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.89 (1H, br s, NH), 7.60 (1H, d,  $J$  0.9, 6-H), 7.36–7.26 (10 H, m, Bn), 6.23 (1H, d,  $J$  7.8, 1'-H), 5.98 (1H, dd,  $J$  11.2, 17.7, 1''-H), 5.66 (1H, d,  $J$  17.7, 2''-H<sub>a</sub>), 5.55 (1H, d,  $J$  11.5, 2''-H<sub>b</sub>), 4.75–4.37 (6H, m, 2'-H, 4'-H, Bn), 3.84 (1H, dd,  $J$  2.7, 10.8, 5'-H<sub>a</sub>), 3.58 (1H, d,  $J$  11.2, 5'-H<sub>b</sub>), 3.23 (1H, d,  $J$  10.6, 2'-OH), 1.50 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0323】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 163.7 (C-4), 151.3 (C-2), 138.0, 136.9 (Bn), 136.0 (C-6), 131.2 (C-1''), 128.8, 128.6, 128.3, 127.8, 127.7, 127.3 (Bn), 120.7 (C-2''), 111.3 (C-5), 87.3 (C-1'), 84.6 (C-3'), 81.4 (C-4'), 78.0 (C-2'), 73.7 (C-5'), 70.0, 66.4 (Bn), 11.8 (CH<sub>3</sub>).

## 【0324】

実測値: C, 66.8; H, 6.2; N, 5.9;  $C_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$  の理論値 C, 67.2; H, 6.1; N, 6.0%。

## 【0325】

## 実施例26

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-2-O-メタンスルホニル-3-C-ビニル- $\beta$ -D-リボフラノシリチミン(25)。

ヌクレオシド24 (2.57 g, 5.53 mmol)を無水ピリジン( $18 \text{ cm}^3$ )に溶解し、0°Cに冷却した。塩化メタンスルホニル(1.28 cm<sup>3</sup>, 16.6 mmol)を滴加し、混合物を室温で30分間攪拌した。反応を水(5 cm<sup>3</sup>)で失活させ、得られた混合物をジクロロメタン( $3 \times 80 \text{ cm}^3$ )で抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 120 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、黄色の発泡体としてヌクレオシド25を得た(2.53 g, 8

4%。

### 【0326】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.92 (1H, br s, NH), 7.71 (1H, d,  $J$  1.4, 6-H), 7.41–7.28 (10H, m, Bn), 6.57 (1H, d,  $J$  7.8, 1'-H), 5.99–5.61 (4H, m, 2'-H, 1''-H and 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>), 4.86–4.50 (4H, m, Bn), 4.37 (1H, dd,  $J$  1.5, 2.4, 4'-H), 3.82 (1H, dd,  $J$  2.6, 11.0, 5'-H<sub>a</sub>), 3.55 (1H, dd,  $J$  1.2, 11.0, 5'-H<sub>b</sub>), 3.02 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.47 (3H, d,  $J$  1.1, CH<sub>3</sub>)。

### 【0327】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 163.7 (C-4), 151.5 (C-2), 138.7, 136.7 (Bn), 135.7 (C-6), 130.9 (C-1''), 128.8, 128.5, 128.4, 127.6, 127.0 (Bn), 121.8 (C-2''), 111.9 (C-5), 85.1 (C-1'), 84.5 (C-3'), 84.0 (C-4'), 80.7 (C-2'), 73.7 (C-5'), 69.2, 67.7 (Bn), 38.9 (CH<sub>3</sub>), 11.8 (CH<sub>3</sub>)。

### 【0328】

#### 実施例27

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-3-C-ビニル- $\beta$ -D-アラビノフラノシリル)チミン(26)。

エタノール( $50 \text{ cm}^3$ )、水( $50 \text{ cm}^3$ )および1M水性水素化ナトリウム( $15 \text{ cm}^3$ )の混合物中のヌクレオシド25( $2.53 \text{ g}$ ,  $4.66 \text{ mmol}$ )溶液を還流させながら16時間攪拌した。混合物を希塩酸水で中和し、溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン( $3 \times 120 \text{ cm}^3$ )で抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 150 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色発泡体として26を得た( $1.61 \text{ g}$ , 74%)。

### 【0329】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.89 (1H, br s, NH), 7.50 (1H, d,  $J$  1.1, 6-H), 7.41–7.26 (Bn), 6.28 (1H, d,  $J$  2.8, 1'-H), 6.05 (1H, dd,  $J$  11.1, 17.9, 1''-H), 5.58–5.50 (2H, m, 2''-H<sub>a</sub>, 2''-H<sub>b</sub>), 4.98 (1H, d,  $J$  9.0, 2'-OH), 4.64–4.31 (6H, m, 2'-H, 4'-H, Bn), 3.73 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 1.73 (1H, d,  $J$  0.6, CH<sub>3</sub>)。

### 【0330】

$\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 165.1 (C-4), 150.5 (C-2), 138.4, 138.0, 136.7 (C-6,  $\text{Bn}$ ), 130.4 (C-1'), 128.8, 128.6, 128.5, 128.1, 128.0, 127.8 ( $\text{Bn}$ ), 120.6 (C-2''), 108.1 (C-5), 88.6 (C-1'), 87.9 (C-3'), 87.2 (C-4'), 73.7 (C-2'), 71.8 (C-5'), 69.7, 66.3 ( $\text{Bn}$ ), 12.3 ( $\text{CH}_3$ )。

## 【0331】

実測値: C, 66.8; H, 6.2; N, 5.9;  $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_6$  の理論値 C, 67.2; H, 6.1; N, 6.0。

## 【0332】

## 実施例28

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-3-C-ヒドロキシメチル- $\beta$ -D-アラビノフランオシル)チミン(27)。

THF(15 cm<sup>3</sup>)と水(15 cm<sup>3</sup>)の混合物中のヌクレオシド26 (2.00 g, 4.31 mmol)溶液に過ヨウ素酸ナトリウム(2.76 g, 12.9 mmol)およびt-ブタノール中の四酸化オスミウム2.5%溶液(w/w, 0.54 cm<sup>3</sup>, 43  $\mu$ mol)を加えた。反応を室温で18時間攪拌し、水(50 cm<sup>3</sup>)で失活させ、混合物をジクロロメタン(2 × 100 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 75 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、減圧下で蒸発させた。残渣をTHF(15 cm<sup>3</sup>)と水(15 cm<sup>3</sup>)の混合物に再び溶解し、水素化ホウ素ナトリウム(488 mg, 12.9 mmol)を加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌し、水(50 cm<sup>3</sup>)を加え、混合物をジクロロメタン(2 × 100 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 75 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色発泡体としてヌクレオシド27を得た(732 mg, 36%)。

## 【0333】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 11.09 (1H, br s, NH), 7.41 (1H, d,  $J$  1.0, 6-H), 7.38–7.26 (Bn), 6.16 (1H, d,  $J$  2.6, 1'-H), 5.12 (1H, d,  $J$  5.4, 2'-OH), 4.66–4.29 (6H, m, 2'-H, 4'-H,  $\text{Bn}$ ), 4.02–3.96 (2H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 3.90 (1H, dd,  $J$  7.2, 9.7, 5'-H<sub>a</sub>), 3.79 (1H, dd,  $J$  5.6, 9.7, 5'-H<sub>b</sub>), 2.49 (1H, t,  $J$  6.4, 1''-OH), 1.68 (3H, d,  $J$  0.6,  $\text{CH}_3$ );

## 【0334】

$\delta_c$  ( $CDCl_3$ ) 166.1 (C-4), 150.6 (C-2), 139.0, 137.9, 137.0 (C-6,  $Bn$ ), 128.7, 128.6, 128.4, 128.3, 128.0 ( $Bn$ ), 107.5 (C-5), 88.2 (C-1'), 88.1 (C-3'), 84.2 (C-4'), 73.7 (C-5'), 72.1 (C-2'), 69.3, 65.4 ( $Bn$ ), 58.6 (C-1''), 12.3 ( $CH_3$ )。

## 【0335】

## 実施例29

(1R,2R,4R,5S)-1-ベンジルオキシ-2-ベンジルオキシメチル-4-(チミン-1-イル)-3,6-ジオキサビシクロ[3.2.0]ヘプタン(28)。

無水ピリジン( $20\text{ cm}^3$ )中の化合物27(2.26 g, 4.83 mmol)溶液を $-40^\circ C$ で攪拌し、無水ピリジン( $10\text{ cm}^3$ )中の塩化メタンスルホニル溶液( $0.482\text{ cm}^3$ , 4.83 mmol)を加えた。反応混合物を室温で17時間攪拌し、水( $50\text{ cm}^3$ )を加え、混合物をジクロロメタン( $2 \times 100\text{ cm}^3$ )で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 100\text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥し( $Na_2SO_4$ )、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、中間生成物を得た。これを溶媒の蒸発後に無水DMF( $15\text{ cm}^3$ )に溶解した。この溶液を無水DMF( $15\text{ cm}^3$ )中の60%水素化ナトリウム懸濁液(461 mg, 11.5 mmol)に $0^\circ C$ で滴加した。反応を室温で30分間攪拌し、水( $60\text{ cm}^3$ )で失活させた。希塩酸水で中和した後、混合物をジクロロメタン( $150\text{ cm}^3$ )に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 100\text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $Na_2SO_4$ )。溶媒を蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色発泡体としてヌクレオシド28を得た(2.00 g, 93%)。

## 【0336】

$\delta_{H}$  ( $CDCl_3$ ) 9.13 (1H, br s, NH), 7.55 (1H, d,  $J$  1.4, 6-H), 7.40–7.26 ( $Bn$ ), 5.99 (1H, d,  $J$  2.5, 1'-H), 5.30 (1H, d,  $J$  2.7, 2'-H), 4.88–4.57 (6H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>,  $Bn$ ), 4.22–4.19 (1H, m, 4'-H), 3.92 (1H, dd,  $J$  6.2, 10.8, 5'-H<sub>a</sub>), 3.82 (1H, dd,  $J$  3.7, 10.8, 5'-H<sub>b</sub>), 1.91 (3H, d,  $J$  1.3,  $CH_3$ )。

## 【0337】

$\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 163.8 (C-4), 150.3 (C-2), 137.6 (C-6), 137.5, 137.0 (Bn), 128.7, 128.6, 128.2, 128.0, 127.8, 127.3 (Bn), 109.8 (C-5), 85.7 (C-3'), 84.1 (C-1'), 83.5 (C-4'), 79.7 (C-1''), 73.9 (C-2''), 73.6 (C-5''), 68.6, 67.8 (Bn), 12.4 ( $\text{CH}_3$ )。

## 【0338】

FAB m/z 451 [M+H]<sup>+</sup>, 473 [M+Na]<sup>+</sup>.

実測値: C, 66.3; H, 5.9; N, 6.1;  $C_{25}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6$  の理論値 C, 66.7; H, 5.8; N, 6.2%。

## 【0339】

## 実施例30

(1R,2R,4R,5S)-1-ヒドロキシ-2-ヒドロキシメチル-4-(チミン-1-イル)-3,6-ジオキサビシクロ[3.2.0]ヘプタン(29)。

エタノール(3  $\text{cm}^3$ )中のヌクレオシド28溶液(180 mg, 0.40 mmol)に炭素上の10%水酸化パラジウム(90 mg)を加えた。混合物をアルゴンで数回脱気し、水素雰囲気下に置いた。反応混合物を室温で6時間攪拌し、次いでセライトで濾過した。濾液を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(96:4, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド29を得た(92 mg, 86%)。

## 【0340】

$\delta_n$  ( $\text{D}_2\text{OD}$ ) 7.79 (1H, d,  $J$  1.2, 6-H), 5.91 (1H, d,  $J$  2.5, 1'-H), 4.96 (1H, d,  $J$  2.5, 2'-H), 4.92 (1H, d,  $J$  7.4, 1''-H<sub>a</sub>), 4.58 (1H, dd,  $J$  0.9, 7.4, 1''-H<sub>b</sub>), 3.98 (1H, dd,  $J$  7.3, 12.8, 5'-H<sub>a</sub>), 3.87-3.82 (2H, m, 4'-H, 5'-H<sub>b</sub>), 3.34 (2H, s, 3'-OH, 5'-OH), 1.87 (3H, d,  $J$  1.3,  $\text{CH}_3$ )。

## 【0341】

$\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 166.5 (C-4), 152.1 (C-2), 140.1 (C-6), 110.1 (C-5), 91.2 (C-2'), 85.1 (C-1'), 84.0 (C-4'), 79.6 (C-3'), 78.6 (C-1''), 61.1 (C-5''), 12.3 ( $\text{CH}_3$ )。

## 【0342】

## 実施例31

(1R,2R,4R,5S)-1-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-2-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-4-(チミン-1-イル)-3,6-ジオキサビシクロ[3.2.0]ヘプタン(30)。

無水ピリジン(4 cm<sup>3</sup>)中のジオール29溶液(250 mg, 0.925 mmol)に4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(376 mg, 1.11 mmol)を加え、混合物を室温で18時間攪拌した。反応をメタノール(1.5 cm<sup>3</sup>)で失活させ、混合物を減圧下で蒸発させた。ジクロロメタン(30 cm<sup>3</sup>)中の残渣の溶液を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 20 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し中間生成物を得、それを無水ジクロロメタン(7.0 cm<sup>3</sup>)に溶解した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.64 cm<sup>3</sup>, 3.70 mmol)、次いで2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.41 cm<sup>3</sup>, 1.85 mmol)を加え、混合物を室温で25時間攪拌した。反応をメタノール(3 cm<sup>3</sup>)で失活させ、混合物を酢酸エチル(70 cm<sup>3</sup>)に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 50 cm<sup>3</sup>)およびブライン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発させた。残渣を石油エーテル/ジクロロメタン/酢酸エチル/トリメチルアミン(100:45:45:10, v/v/v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製した。得られた残渣をトルエン(2 cm<sup>3</sup>)に溶解し、-50°Cで攪拌しながら石油エーテルから析出した。溶媒を蒸発させた後、残渣を無水アセトニトリル(4 × 5 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させ、白色発泡体として30を得た(436 mg, 61%)。

## 【0343】

<sup>31</sup>P NMR (CDCl<sub>3</sub>) 146.6。

## 【0344】

## 実施例32

3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラノース(31)。

-5°Cの無水DMF(100 cm<sup>3</sup>)中の3-O-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラノース(R. D. Youssefye, J. P. H. Verheyden お

より J. G. Moffatt, J. Org. Chem., 1979, 44, 1301(20.1 g, 0.064 mol)溶液に NaH懸濁液(鉱油中 60%(w/w), 1時間 30分間に 4回、合計 2.85 g, 0.075 mol)を加えた。臭化ベンジル(8.9 cm<sup>3</sup>, 0.075 mol)を滴加し、室温で 3時間攪拌し、そこへ氷冷水(50 cm<sup>3</sup>)を加えた。混合物を EtOAc (4 × 100 cm<sup>3</sup>)で抽出し、合わせた有機相を乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。蒸発後、残渣を石油エーテル中 5% EtOAc(v/v)で溶出させてシリカゲルクロマトグラフィで精製し、化合物 31を得た(18.5 g, 71%)。

## 【0345】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 138.0, 137.4, 128.5, 128.3, 128.0, 127.8, 127.6 (Bn), 113.5 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 104.4 (C-1), 86.5 (C-4), 78.8, 78.6 (Bn), 73.6, 72.6, 71.6 (C-2, C-3, C-5), 63.2, (C-1'), 26.7, 26.1 (CH<sub>3</sub>)。

## 【0346】

## 実施例33

4-C-(アセトキシメチル)-3,5-ジ-O-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-1)ポフラノース(32)。

無水ピリジン(4.5 cm<sup>3</sup>)中のフラノース 31 溶液(913 mg, 2.28 mmol)に 無水酢酸(1.08 cm<sup>3</sup>, 11.4 mmol)を滴加し、反応混合物を室温で 3時間攪拌した。反応を氷冷水(50 cm<sup>3</sup>)を加えて失活させ、ジクロロメタン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 50 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、透明の油として化合物 32を得た(911 mg, 90%)。

## 【0347】

$\delta_h$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.34-7.25 (10 H, m, Bn), 5.77 (1 H, d, J 3.6, 1-H), 4.78-4.27 (8 H, m, Bn, H-5a, H-5b, H-3, H-2), 3.58 (1 H, d, J 10.3, H-1'a), 3.48 (1 H, d, J 10.5, H-1'b), 2.04 (3 H, s, COCH<sub>3</sub>), 1.64 (3 H, s, CH<sub>3</sub>), 1.34 (3 H, s, CH<sub>3</sub>)。

## 【0348】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 171.1 (C=O), 138.2, 137.9, 128.6, 128.1, 128.0, 128.0, 127.8

(Bn), 114.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 104.5 (C-1), 85.4 (C-4), 79.3, 78.6 (C-2, C-3), 73.7, 72.7, 71.2 (Bn, C-5), 64.9 (C-1'), 26.7, 26.3 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.0 (COCH<sub>3</sub>).

## 【0349】

実測値: C, 67.0; H, 6.5; C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>7</sub>, 1/4H<sub>2</sub>Oの理論値C, 67.2; H, 6.9%.

## 【0350】

## 実施例34

4-C-(アセトキシメチル)-1,2-ジ-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル-D-リボフラノース(33)。

80%酢酸(10 cm<sup>3</sup>)中のフラノース32溶液(830 mg, 1.88 mmol)を90°Cで4時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をエタノール(3 × 5 cm<sup>3</sup>)、トルエン(3 × 5 cm<sup>3</sup>)および無水ピリジン(3 × 5 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させ、無水ピリジン(3.7 cm<sup>3</sup>)に再び溶解した。無水酢酸(2.85 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液を室温で72時間攪拌した。溶液を水冷水(20 cm<sup>3</sup>)に注ぎ、混合物をジクロロメタン(2 × 20 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 20 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、透明の油として33( $\beta : \alpha \sim 1:3$ )を得た(789 mg, 86%)。

## 【0351】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 171.0, 170.3, 170.0, 169.3 (C=O), 138.1, 137.6, 136.3, 128.9, 128.6, 128.2, 128.0, 128.0, 127.9, 127.7, 124.0 (Bn), 97.8, 97.8 (C-1), 87.0, 85.0, 78.9, 74.5, 74.4, 73.8, 73.6, 72.0, 71.8, 71.0, 70.9, 64.6, 64.4 (C-2, C-3, C-4, Bn, C-5, C-1'), 21.0, 20.8, 20.6 (COCH<sub>3</sub>).

## 【0352】

実測値: C, 64.2; H, 6.3; C<sub>26</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>の理論値C, 64.2; H, 6.2%.

## 【0353】

## 実施例35

1-(4-C-(アセトキシメチル)-2-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(34)。

無水アセトニトリル(14.5 cm<sup>3</sup>)中のアノマー混合物33(736 mg, 1.51 mmol)とチミン(381 mg, 3.03 mmol)の攪拌溶液に、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(2.61 cm<sup>3</sup>, 10.6 mmol)を加えた。反応混合物を還流させながら1時間攪拌し、次いで0°Cに冷却した。攪拌しながらトリメチルシリルトリフレート(0.47 cm<sup>3</sup>, 2.56 mmol)を滴加し、溶液を65°Cで2時間攪拌した。反応を冷たい炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(15 cm<sup>3</sup>)で失活させ、ジクロロメタン(3 × 10 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 10 cm<sup>3</sup>)およびブライン(2 × 10 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド34を得た(639 mg, 76%)。

## 【0354】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.98 (1 H, br s, NH), 7.39–7.26 (11 H, m, Bn, 6-H), 6.22 (1 H, d, J 5.3, 1'-H), 5.42 (1 H, t, J 5.4, 2'-H), 4.63–4.43 (5H, m, 3'-H, Bn), 4.41 (1 H, d, J 12.2, 5'-H<sub>a</sub>), 4.17 (1 H, d, J 12.1, 5'-H<sub>b</sub>), 3.76 (1 H, d, J 10.2, 1''-H<sub>a</sub>), 3.51 (1 H, d, J 10.4, 1''-H<sub>b</sub>), 2.09 (3 H, s, COCH<sub>3</sub>), 2.03 (3 H, s, COCH<sub>3</sub>), 1.53 (3 H, d, J 0.9, CH<sub>3</sub>)。

## 【0355】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 170.8, 170.4 (C=O), 163.9 (C-4), 150.6 (C-2), 137.4 (C-6) 137.4, 136.1, 128.9, 128.8, 128.4, 128.2, 127.9 (Bn), 111.7 (C-5), 87.2, 87.2, 86.1 (C-1', C-3', C-4'), 77.6 (C-2'), 74.8, 73.9, 71.1, 63.8 (Bn, C-1'', C-5'), 20.9, 20.8 (COCH<sub>3</sub>), 12.0 (CH<sub>3</sub>)。

## 【0356】

FAB-MS m/z 553 [M+H]<sup>+</sup>.

実測値: C, 62.7; H, 5.9; N, 4.7; C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> の理論値 C, 63.0; H, 5.8; N, 5.1%。

## 【0357】

実施例36

1-(3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-(ヒドロキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(3

5)。

メタノール(5.5 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド34(553 mg, 1.05 mmol)の攪拌溶液にナトリウムメトキシド(287 mg, 5.25 mmol)を加えた。反応混合物を室温で10分間攪拌し、次いで希塩酸で中和した。溶媒を部分的に蒸発させ、ジクロロメタン(2 × 20 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 20 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、白色固体として35を得た(476 mg, 97%)。

### 【0358】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.47 (1 H, d, J 1.0 H-6), 7.36–7.22 (10 H, m, Bn), 6.07 (1 H, d, J 3.8, 1'-H), 4.87 (1 H, d, J 11.7, Bn), 4.55 (1 H, d, J 11.7, Bn), 4.50–4.32 (4 H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 3.84–3.53 (4 H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 1'-H<sub>a</sub>, 1'-H<sub>b</sub>), 1.50 (3 H, d, J 1.1, CH<sub>3</sub>)。

### 【0359】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 164.3 (C-4), 151.3 (C-2), 137.6 (C-6) 136.4, 136.3, 128.8, 128.6, 128.4, 128.3, 127.9 (Bn), 111.1 (C-5), 91.1, 91.0, 88.1 (C-1', C-3', C-4'), 77.4 (C-2'), 74.8, 73.8, 71.4, 63.2 (Bn, C-5', C-1''), 12.0 (CH<sub>3</sub>)。

### 【0360】

FAB-MS m/z 491 [M+Na]<sup>+</sup>。

実測値: C, 63.4; H, 6.0; N, 5.5; C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1/4H<sub>2</sub>O の理論値 C, 63.5; H, 6.1; N, 5.9%。

### 【0361】

#### 実施例37

##### 中間生成物35A<sub>0</sub>

無水ピリジン(1.3 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド35溶液(225 mg, 0.48 mmol)を0°Cで攪拌し、塩化p-トルエンスルホニル(118 mg, 0.62 mmol)を少量ずつ加えた。溶液を室温で16時間攪拌し、塩化p-トルエンスルホニル(36 mg, 0.19 mmol)をさらに加えた。さらに4時間攪拌し、氷冷水(15 cm<sup>3</sup>)を加えた後、ジクロロメタン(2 × 15 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 15

$\text{cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、中間生成物35A (140 mg)を得た。これは精製せずに次の工程で用いられた。

### 【0362】

#### 実施例38

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(36)。

中間生成物35A (159 mg)を無水DMF (0.8  $\text{cm}^3$ )に溶解した。この溶液を無水DMF (0.8  $\text{cm}^3$ )中の鉱油中60% 水素化ナトリウム懸濁液 (w/w, 32 mg, 0.80 mmol)に0°Cで攪拌しながら滴加した。混合物を室温で72時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタン(10  $\text{cm}^3$ )に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 5  $\text{cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固形物として二環式ヌクレオシド36を得た(65.7 mg, 57%)。

### 【0363】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.24 (1 H, br s, NH), 7.49 (1 H, s, 6-H), 7.37–7.26 (10 H, m, Bn), 5.65 (1 H, s, 1'-H), 4.70–4.71 (5 H, m, Bn, 2'-H), 4.02–3.79 (5 H, m, 3'-H, 5'- $H_a$ , 5'- $H_b$ , 1''- $H_a$ , 1''- $H_b$ ), 1.63 (3 H, s,  $\text{CH}_3$ )。

### 【0364】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.3 (C-4), 150.1 (C-2), 137.7, 137.1 (Bn), 135.0 (C-6), 128.8, 128.7, 128.4, 128.0, 127.9 (Bn), 110.4 (C-5), 87.5, 87.3 (C-1', C-3'), 76.7, 75.8, 73.9, 72.3, 72.1 (Bn, C-5', C-2', C-4'), 64.5 (C-1''), 12.3 ( $\text{CH}_3$ )。

### 【0365】

FAB-MS  $m/z$  451 [ $M+\text{H}$ ]<sup>+</sup>。

### 【0366】

#### 実施例39

(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(37)。

エタノール(1.5 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド36溶液(97 mg, 0.215 mmol)を室温で攪拌し、炭素上の20%水酸化パラジウム(50 mg)を加えた。混合物をアルゴンで数回脱ガスし、風船で水素雰囲気に置いた。4時間攪拌した後、混合物をジクロロメタン-メタノール(97:3, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド37を得た(57 mg, 98%)。

### 【0367】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CD}_3\text{SO}$ ) 11.33 (1H, br s, NH), 7.62 (1H, d, J 1.1 Hz, 6-H), 5.65 (1H, d, J 4.4 Hz, 3'-OH), 5.41 (1H, s, 1'-H), 5.19 (1H, t, J 5.6 Hz, 5'-H), 4.11 (1H, s, 2'-H), 3.91 (1H, d, J 4.2 Hz, 3'-H), 3.82 (1H, d, J 7.7 Hz, 1''-H<sub>a</sub>), 3.73 (1H, s, H'-5a), 3.76 (1H, s, 5'-H<sub>b</sub>), 3.63 (1H, d, J 7.7 Hz, 1''-H<sub>b</sub>), 1.78 (3H, d, J 0.7 Hz, CH<sub>3</sub>)。

### 【0368】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 166.7 (C-4), 152.1 (C-2), 137.0 (C-6), 110.9 (C-5), 90.5, 88.4 (C-1', C-4'), 80.9, 72.5, 70.4 (C-2', C-3', C-5'), 57.7 (C-1''), 12.6 (CH<sub>3</sub>)。

### 【0369】

EI-MS m/z 270 [M]<sup>+</sup>.

### 【0370】

#### 実施例40

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(38)。

無水ピリジン(5 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド37溶液(1.2 g, 4.44 mmol)に、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(2.37 g, 7.0 mmol)を0°Cで加えた。溶液を室温で2時間攪拌し、反応を氷冷水(10 cm<sup>3</sup>)で失活させ、ジクロロメタン(3 × 15 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 10 cm<sup>3</sup>)およびブライン(2 × 10 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルク

ロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド38を得た(2.35 g, 93%)。

### 【0371】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.89 (1H, br s, NH), 7.64 (1H, s, 6-H), 7.47–7.13 (9H, m, DM T), 6.96–6.80 (4H, m, DMT), 5.56 (1H, s, 1'-H), 4.53 (1H, br s, 2'-H), 4.31 (1H, m, 3'-H), 4.04–3.75 (9H, m, 1''-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>, 3'-OH, OCH<sub>3</sub>), 3.50 (2H, br s, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 1.65 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

### 【0372】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.47 (C-4), 158.66 (DMT), 150.13 (C-2), 144.56, 135.46, 135.35, 134.78, 130.10, 129.14, 128.03, 127.79, 127.05 (C-6, DMT), 113.32, 113.14 (DMT), 110.36 (C-5), 89.17, 88.16, 87.05 (C-1', C-4', DMT), 79.36, 71.81, 70.25, 58.38 (C-2', C-3', C-5', C-1''), 55.22 (OCH<sub>3</sub>), 12.57 (CH<sub>3</sub>).

### 【0373】

FAB-MS  $m/z$  595 [M+Na]<sup>+</sup>, 573 [M+H]<sup>+</sup>.

### 【0374】

#### 実施例41

(1R,3R,4R,7S)-7-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(39)。

室温の無水ジクロロメタン( $6 \text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド38溶液(2.21 g, 3.86 mmol)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン( $4 \text{ cm}^3$ )および2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト( $1 \text{ cm}^3$ , 4.48 mmol)を加え、1時間攪拌した。MeOH( $2 \text{ cm}^3$ )を加え、混合物を酢酸エチル( $10 \text{ cm}^3$ )で希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 5 \text{ cm}^3$ )およびブライン( $3 \times 5 \text{ cm}^3$ )で連続的に洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いた塩基性アルミナカラムクロマトグラフィで精製し、白色発砲体として39を得た。この残渣をジクロロメタン( $2 \text{ cm}^3$ )に溶解し、生成物を激しく攪拌しながら石油エーテル( $100 \text{ cm}^3$ 、-30°Cに冷却)から析出させ

た。析出物を濾過によって回収し、乾燥し、白色固体としてヌクレオシド39を得た(2.1 g, 70%)。

### 【0375】

$\delta_p$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 149.06, 148.74.

### 【0376】

FAB-MS  $m/z$  795 [ $M+\text{Na}]^+$ , 773 [ $M+\text{H}]^+$ .

### 【0377】

#### 実施例42

1-(2-O-アセチル-4-C-アセトキシメチル-3,5-ジ-O-ベンジル- $\beta$ -D-リボフラノシル)ウラシル(40)。

無水アセトニトリル( $65 \text{ cm}^3$ )中のアノマー混合物33 (3.0 g, 6.17 mmol)とウラシル(1.04 g, 9.26 mmol)の攪拌溶液に、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド( $9.16 \text{ cm}^3$ , 37.0 mmol)を加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌し、0°Cに冷却した。トリメチルシリルトリフレート( $1.8 \text{ cm}^3$ , 10.0 mmol)を滴加し、溶液を60°Cで2時間攪拌した。反応を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $10 \text{ cm}^3$ )を加えて0°Cに失活させ、ジクロロメタン( $3 \times 20 \text{ cm}^3$ )で抽出した。合わせた有機相をブライン( $2 \times 20 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド40を得た(2.5 g, 75%)。

### 【0378】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.57 (1H, br s, NH), 7.63 (1H, d,  $J$  8.2, 6-H), 7.40–7.24 (10H, m, Bn), 6.18 (1H, d,  $J$  4.5, 1'-H), 5.39–5.32 (2H, m, 2'-H, 5-H), 4.61 (1H, d,  $J$  11.6, Bn), 4.49–4.40 (5H, m, 3'-H, Bn, 1''-H<sub>a</sub>), 4.37 (1H, d,  $J$  12.3, 1''-H<sub>b</sub>), 3.76 (1H, d,  $J$  10.1, 5'-H<sub>a</sub>), 3.49 (1H, d,  $J$  10.1, 5'-H<sub>b</sub>), 2.09 (s, 3H,  $\text{COCH}_3$ ), 2.04 (3H, s,  $\text{COCH}_3$ ).

### 【0379】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 170.47, 169.94 (C=O), 163.32 (C-4), 150.30 (C-2), 140.24 (C-6), 137.15, 136.95, 128.65, 128.52, 128.32, 128.19, 128.02, 127.77 (Bn),

102.57 (C-5), 87.41, 86.14 (C-1', C-4'), 77.09, 74.84, 74.51, 73.75, 70.60, 63.73 (C-2', C-3', C-5', C-1'', Bn), 20.79, 20.68 (COCH<sub>3</sub>).

## 【0380】

FAB-MS m/z 539 [M]<sup>+</sup>.

## 【0381】

## 実施例43

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)ウラシル(41)。

メタノール(25 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド40(2.0 g, 3.7 mmol)の攪拌溶液に、ナトリウムメトキシドを加えた(0.864 g, 95%, 16.0 mmol)。反応混合物を室温で10分間攪拌し、20% 水性塩酸で中和した。溶媒を部分的に蒸発させ、残渣を酢酸エチル(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 20 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98.5:1.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として41を得た(1.58 g, 95%)。

## 【0382】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 9.95 (1H, br s, NH), 7.69 (d, J 8.1, 6-H), 7.35–7.17 (10H, m, Bn), 6.02 (1H, d, J 2.3, 1'-H), 5.26 (1H, d, J 8.1, 5-H), 4.80 (1H, d, J 11.7, Bn), 4.47 (1H, d, J 11.7, Bn), 4.45–4.24 (4H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 3.81 (1H, d, J 11.9, 1''-H<sub>a</sub>), 3.69 (2H, br s, 2'-OH, 1''-OH), 3.67 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>b</sub>), 3.48 (1H, d, J 10.3, 5'-H<sub>b</sub>).

## 【0383】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.78 (C-4), 150.94 (C-2), 140.61 (C-6), 137.33, 137.22, 128.59, 128.18, 128.01 (Bn), 102.16 (C-5), 91.46, 88.36 (C-1', C-4'), 76.73, 74.66, 73.71, 73.29, 70.81, 62.81 (C-2', C-3', C-5', C-1'', Bn).

## 【0384】

FAB-MS m/z 455 [M+H]<sup>+</sup>.

## 【0385】

## 実施例44

## 中間生成物42。

ヌクレオシド41 (1.38 g, 3.0 mmol)、無水ピリジン (2 cm<sup>3</sup>) および無水ジクロロメタン (6 cm<sup>3</sup>) の溶液を -10°C で攪拌し、塩化p-トルエンスルホニル (0.648 g, 3.4 mmol) を 1 時間で少量ずつ加えた。溶液を -10°C で 3 時間攪拌した。反応を氷冷水 (10 cm<sup>3</sup>) を加えて失活させ、混合物をジクロロメタン (3 × 50 cm<sup>3</sup>) で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液 (3 × 20 cm<sup>3</sup>) で洗浄し、乾燥した (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール (99:1, v/v) を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、中間生成物42 (0.9 g)を得た。これは精製せずに次の工程で使用する。

## 【0386】

## 実施例45

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-(ウラシル-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ [2.2.1]ヘプタン (43)。

化合物42 (0.7 g) を無水DMF (3 cm<sup>3</sup>) に溶解し、60%水素化ナトリウム懸濁液 (w/w, 0.096 g, 24 mmol) を 0°C で 10 分間で 4 回に分けて加え、反応混合物を室温で 1-2 時間攪拌した。反応をメタノール (10 cm<sup>3</sup>) で失活させ、溶媒を減圧下で除去した。残渣をジクロロメタン (20 cm<sup>3</sup>) に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液 (3 × 6 cm<sup>3</sup>) で洗浄し、乾燥した (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール (99:1, v/v) を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、ヌクレオシド43 を得た (0.30 g, 60%)。

## 【0387】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 9.21 (1H, br s, NH), 7.70 (1H, d, J 8.2, 6-H), 7.37-7.24 (10 H, m, Bn), 5.65 (1H, s, 1'-H), 5.52 (1H, d, J 8.2, 5-H); 4.68-4.45 (5H, m, 2'-H, Bn), 4.02-3.55 (5H, m, 3'-H, 5'-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 1''-H<sub>b</sub>).

## 【0388】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.33 (C-4), 149.73 (C-2), 139.18 (C-6), 137.46, 136.81, 128.58, 128.54, 128.21, 128.10, 127.79, 127.53 (Bn), 101.66 (C-5), 87.49, 87.33 (C-1', C-4'), 76.53, 75.71, 73.77, 72.33, 72.00, 64.35 (C-2', C-3', C-5', C-1''), Bn).

## 【0389】

FAB-MS  $m/z$  459 [M+Na]<sup>+</sup>.

## 【0390】

## 実施例46

(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(ウラシル-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(44)。

無水エタノール(2 cm<sup>3</sup>)中の化合物43溶液(0.35 g, 0.8 mmol)に炭素上の20%水酸化パラジウム(0.37 g)を加え、混合物を水素で数回脱ガスし、水素雰囲気下で4時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(9:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド44を得た(0.16 g, 78%)。

## 【0391】

$\delta_{\text{H}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 7.88 (1H, d,  $J$  8.1, 6-H), 5.69 (1H, d,  $J$  8.1, 5-H), 5.55 (1H, s, 1'-H), 4.28 (1H, s, 2'-H), 4.04 (1H, s, 3'-H), 3.96 (1H, d,  $J$  7.9, 1''-H<sub>a</sub>), 3.91 (2H, s, 5'-H), 3.76 (1H, d,  $J$  7.9, 1''-H<sub>b</sub>).

## 【0392】

$\delta_{\text{C}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 172.95 (C-4), 151.82 (C-2), 141.17 (C-6), 101.97 (C-5), 90.52, 88.50 (C-1', C-4'), 80.88, 72.51, 70.50, 57.77 (C-2', C-3', C-5', C-1'').

## 【0393】

FAB-MS  $m/z$  257 [M+H]<sup>+</sup>.

## 【0394】

## 実施例47

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-(ウラシル-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(45)。

無水ピリジン(0.5 cm<sup>3</sup>)中の化合物44溶液(0.08 g, 0.31 mmol)に、4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(0.203 g, 0.6 mmol)を0°Cで加え、混合物を室温で2時間攪拌した。反応を氷冷水(10 cm<sup>3</sup>)で失活させ、ジクロロメタン(3 × 4 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 3 cm<sup>3</sup>)およ

びブライン( $2 \times 3 \text{ cm}^3$ )で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド45を得た(0.12 g, 69%)。

### 【0395】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.25 (1H, br s, NH), 7.93 (1H, d,  $J$  7.2, 6-H), 7.50–7.15 (9H, m, DMT), 6.88–6.78 (4H, m, DMT), 5.63 (1H, s, 1'-H), 5.59 (1H, d,  $J$  8.0, 5-H), 4.48 (1H, s, 2'-H), 4.26 (1H, s, 3'-H), 3.88 (1H, d,  $J$  8.1, 1''-H<sub>a</sub>), 3.85–3.55 (7H, m, 1''-H<sub>b</sub>, OCH<sub>3</sub>), 3.58–3.40 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>).

### 【0396】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.10 (C-4), 158.60 (DMT), 150.45 (C-2), 147.53 (DMT), 144.51 (C-6), 139.72, 135.49, 135.37, 130.20, 129.28, 128.09, 127.85, 127.07 (DMT), 113.39, 113.17 (DMT), 101.79 (C-5), 88.20, 87.10, 86.87 (C-1', C-4', DMT), 79.25, 71.79, 69.70, 58.13 (C-2', C-3', C-5', C-1''), 55.33 (OCH<sub>3</sub>).

### 【0397】

FAB-MS  $m/z$  559 [M+H]<sup>+</sup>.

### 【0398】

#### 実施例48

(1R,3R,4R,7S)-7-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(ウラシル-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(46)。

無水ジクロロメタン( $2 \text{ cm}^3$ )中の化合物45溶液(0.07 g, 0.125 mmol)に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン( $0.1 \text{ cm}^3$ )および2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト( $0.07 \text{ cm}^3$ , 0.32 mmol)を室温で加えた。1時間攪拌した後、反応をMeOH ( $2 \text{ cm}^3$ )で失活させ、得られた混合物を酢酸エチル ( $5 \text{ cm}^3$ )で希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液 ( $3 \times 2 \text{ cm}^3$ )およびブライン( $3 \times 2 \text{ cm}^3$ )で連続的に洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で蒸発し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマト

グラフィで精製し、白色発泡体を得た。この発泡体をジクロロメタン(2 cm<sup>3</sup>)に溶解し、激しく攪拌しながら生成物を石油エーテル(10 cm<sup>3</sup>, -30°Cに冷却)から析出した。析出物を濾過によって回収し、乾燥し、白色固体として化合物46を得た(0.055 g, 58%)。

## 【0399】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 149.18, 149.02。

## 【0400】

## 実施例49

9-(2-O-アセチル-4-C-アセトキシメチル-3,5-ジ-O-ベンジル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-2-N-イソブチリルグアニン(47)。

無水ジクロロエタン(60 cm<sup>3</sup>)中のアノマー混合物33(1.28 g, 5.6 mmol)および2-N-イソブチリルグアニン(1.8 g, 3.7 mmol)の攪拌溶液にN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(4 cm<sup>3</sup>, 16.2 mmol)を加えた。反応混合物を還流させながら1時間攪拌した。トリメチルシリルトリフレート(1.5 mL, 8.28 mmol)を0°Cで滴加し、溶液を還流させながら2時間攪拌した。反応混合物を1時間半で室温に冷却させた。ジクロロメタンを加えて250 cm<sup>3</sup>に希釈した後、混合物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(200 cm<sup>3</sup>)および水(250 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン中1.25%(200 cm<sup>3</sup>)および1.5%(750 cm<sup>3</sup>)のメタノール(v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として2.10 g(87%)を得た。<sup>1</sup>H-NMR分析により、これは3つのアイソマーからなる(12.5:2.5:1)。この条件で形成された主生成物は化合物47であると思われる(P. Garner, S. Ramakanth, J. Org. Chem. 1988, 53, 1294; H. Vorbruggen, K. Krolikiewicz, B. Bennua, Chem. Ber. 1981, 114, 1234)。個々のアイソマーは分離しておらず、この混合物は次の工程で使用された。

## 【0401】

## 主生成物47:

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 12.25 (br s, NHCO), 9.25 (br s, NH), 7.91 (s, 8-H) 7.39-7.26 (m, Bn), 6.07 (d,  $J$  4.6, 1'-H), 5.80 (dd,  $J$  5.8,  $J$  4.7, 2'-H), 4.72 (d,  $J$  5.9, 3'-H), 4.59-4.43 (m, Bn, 1''-H<sub>a</sub>), 4.16 (d,  $J$  12.1, 1''-H<sub>b</sub>), 3.70

(d,  $\int$  10.1, 5'-H<sub>a</sub>), 3.58 (d,  $\int$  10.1, 5'-H<sub>b</sub>), 2.65 (m, CHCO), 2.05 (s, COCH<sub>3</sub>), 2.01 (s, COCH<sub>3</sub>), 1.22 (d,  $\int$  6.7, CH<sub>3</sub>CH), 1.20 (d,  $\int$  7.0, CH<sub>3</sub>CH)。

## 【0402】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 178.3 (COCH), 170.6, 179.8 (COCH<sub>3</sub>), 155.8, 148.2, 147.6 (グアニン), 137.6, 137.2 (グアニン, Bn), 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 128.0, 127.8, 127.7 (Bn), 121.2 (グアニン), 86.2, 86.0 (C-1', C-4'), 77.8 (C-3'), 74.9, 74.5, 73.7, 70.4 (Bn, C-2', C-5'), 63.5 (C-1''), 36.3 (COCH), 20.8, 20.6 (COCH<sub>3</sub>), 19.0 (CH<sub>3</sub>CH)。

## 【0403】

混合物: FAB-MS m/z 648 [M+H]<sup>+</sup>, 670 [M+Na]<sup>+</sup>.

実測値: C, 60.8; H, 6.0; N, 10.4; C<sub>13</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub> の理論値 C, 61.3; H, 5.6; N, 10.8%。

## 【0404】

## 実施例50

9-(3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-2-N-イソブチリルグアニン(48)。

THF/ピリジン/メタノール(2:3:4, v/v/v) (40 cm<sup>3</sup>)中の化合物47を含む実施例49に記載の混合物の溶液(2.10 g, 3.25 mmol)を-10°Cに冷却し、ナトリウムメトキシド(320 mg, 5.93 mmol)を攪拌溶液に加えた。反応混合物を10°Cで30分間攪拌し、2 cm<sup>3</sup>の酢酸で中和した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/水系(2 × 100 cm<sup>3</sup>)で2回抽出した。有機画分を合わせ、減圧下で蒸発させた。トルエンと共に蒸発させた後、残渣をジクロロメタン(v/v)中のメタノールの勾配(2-7%)によるシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体を得た(1.62 g)。<sup>1</sup>H-NMRより、これは3つのアイソマーからなる(比: 13.5:1.5:1)。

## 【0405】

## 主生成物48:

$\delta_{\text{H}}$  (CDOD) 8.07 (s, 8-H) 7.36-7.20 (m, Bn), 6.05 (d,  $\int$  3.9, 1'-H), 4.81 (d,  $\int$  11.5, Bn), 4.75 (m, 2'-H), 4.56 (d,  $\int$  11.5, Bn), 4.51-4.43 (m, Bn, 3'-H), 3.83 (d,  $\int$  11.7, 1''-H<sub>a</sub>), 3.65 (d,  $\int$  11.7, 1''-H<sub>b</sub>), 3.64 (d,  $\int$

10.6, 5'-H<sub>a</sub>), 3.57 (d, J 10.3, 5'-H<sub>b</sub>), 2.69 (m, CHCO), 1.20 (6 H, d, J 6.8, CH<sub>3</sub>CH)。

## 【0406】

$\delta_c$  (CD<sub>3</sub>OD) 181.6 (COCH), 157.3, 150.2, 149.5 (ゲアニン), 139.4, 139.3, 139.0 (ゲアニン, Bn), 129.5, 129.4, 129.3, 129.2, 129.1, 129.0, 128.9, 128.8 (Bn), 121.2 (ゲアニン), 90.7, 89.6 (C-1', C-4'), 79.2 (C-3'), 75.8, 74.5, 74.3, 72.2 (Bn, C-2', C-5'), 63.1 (C-1''), 36.9 (COCH), 19.4 (CH<sub>3</sub>CH), 19.3 (CH<sub>3</sub>CH)。

## 【0407】

混合物: FAB-MS m/z 564 [M+H]<sup>+</sup>。

## 【0408】

## 実施例51

中間生成物49。

無水ピリジン(6 cm<sup>3</sup>)中の48 (1.6 g)を含む実施例50に記載の混合物の溶液を-20℃で攪拌し、塩化p-トルエンスルホニル(0.81 g, 4.27 mmol)を加えた。溶液を-20℃で1時間、-25℃で2時間攪拌した。次いで混合物をジクロロメタンを加えて100 cm<sup>3</sup>に希釈し、すぐに水(2 × 100 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を分離し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(1-2%, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、中間生成物49を得た(980 mg)。カラムから化合物49を溶出した後、48を含む出発混合物(510 mg)をジクロロメタン中8%メタノール(v/v)を溶出液として溶出した。この物質を濃縮し、減圧下で乾燥し、上記と同様の方法にて処理し、252 mgの中間生成物をさらに得た。中間生成物(1.23 g)をシリカゲルHPLC(Porasil)でパックされたプレパック(PrepPak)カラトリッジ, 15-20 μm, 125A, 流量60 cm<sup>3</sup>/分、溶出液はジクロロメタン中0-4%メタノール(v/v)、120分)で精製した。中間生成物49を含む画分をプールし、濃縮して白色固形物を得た(1.04 g)。<sup>1</sup>H-NMRによれば、これは2つの主生成物すなわち~2:1の比の1''-Oおよび2'-Oモノトシリ化誘導体である。

## 【0409】

FAB-MS m/z 718 [M+H]<sup>+</sup>。

実測値C, 60.4; H, 5.8; N, 9.3; C<sub>36</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S の理論値C, 60.2; H, 5.5; N, 9.8%。

### 【0410】

#### 実施例52

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-(2-N-イソブチリルグアニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(50)。

無水THF (20 cm<sup>3</sup>) 中の中間生成物49溶液(940 mg)に60%水素化ナトリウム懸濁液(w/w, 130 mg, 3.25 mmol)を加え、混合物を室温で1時間攪拌した。酢酸(0.25 mL)を加え、混合物を減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタン (100 cm<sup>3</sup>) に溶解し、水 (2 × 100 cm<sup>3</sup>) で洗浄した。有機相を分離し、減圧下で蒸発させた。残渣をメタノール/ジクロロメタン(1-1.5%, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド50を得た(451 mg, 57%)。

### 【0411】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 12.25 (1H, br s, NHCO), 10.12 (1H, br s, NH), 7.84 (1H, s, 8-H), 7.31-7.15 (10H, m, Bn), 5.72 (1H, s, 1'-H), 4.60-4.46 (5H, m, Bn, 2'-H), 4.14 (1H, s, 3'-H), 4.02 (1H, d, J 7.9, 1''-H), 3.85 (1H, d, J 7.9, 1''-H), 3.78 (2H, s, 5'-H), 2.81 (1H, m, CHCO), 1.24 (3H, d, J 6.8, CH<sub>3</sub>CH), 1.22 (3H, d, J 6.4, CH<sub>3</sub>CH)。

### 【0412】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 179.5 (COCH), 155.6, 148.1, 147.3 (グアニン), 137.3, 136.9, 136.0 (グアニン, Bn), 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.5, 127.4 (Bn), 121.2 (グアニン), 87.1, 86.2 (C-1', C-4'), 77.0 (C-3'), 73.6, 72.5, 72.1 (Bn, C-2', C-5'), 64.9 (C-1''), 36.1 (COCH), 19.0 (CH<sub>3</sub>CH), 18.9 (CH<sub>3</sub>CH)。

### 【0413】

FAB-MS m/z 546 [M+H]<sup>+</sup> .

実測値: C, 63.3; H, 5.9; N, 12.5; C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>6</sub> の理論値 C, 64.0; H, 5.6; N, 12.9%。

### 【0414】

化合物50の別の生成方法。G1AQ。

化合物78(1.5g, 2.51 mmol)と乾燥DCM(50 mL)中のN2-イソブチリルグアニン(0.93 g, 4.06 mmol)の懸濁液に、BSA(N,N-ビストリメチルシリルアセトアミド; 3.33 mL, 13.5 mmol)を加え、混合物を2時間還流させた。トリメチルシリルトリフレート(1.25 mL, 6.9 mmol)を混合物に加え、さらに2時間還流させた。混合物を室温に冷却し、200 mLのDCMで希釈し、NaHCO<sub>3</sub>飽和水溶液および水で洗浄した。シリカゲルカラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン中1-2.5% of CH<sub>3</sub>OH)により1.05g(55%)の所望のアイソマーG1AQおよび上記手順を繰り返すことによってG1AQに変換される380 mgの高流動性アイソマーを得た。水酸化アンモニウム(12 mLの25%水溶液)をG1AQ溶液(12 mL メタノール中1.05 g)に加え、混合物を室温で1時間攪拌した。濃縮後、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィ(ジクロロメタン中1-3% CH<sub>3</sub>OH)で精製し、白色固体として700 mgのG3を得た。無水THF(15 mL)中の700 mgのG3をNaH(鉱油中225 mgの60%懸濁液)で処理した。30分後、反応を1.25 mLの酢酸を加えることにより失活させ、混合物を減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタンに溶解し、NaHCO<sub>3</sub>および水で洗浄し、メタノール/DCMの0.5-3%勾配でシリカゲルクロマトグラフィで精製した。400 mg(75%)の50を得た。

#### 【0415】

##### 実施例53

(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(2-N-イソブチリルグアニ-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(51)。

ヌクレオシド50(717 mg, 1.31 mmol)と炭素上の10%パラジウム(500 mg)の混合物を室温でメタノール(8 cm<sup>3</sup>)に懸濁した。混合物を減圧下で数回脱ガスし、水素雰囲気下に置いた。24時間攪拌した後、混合物をメタノール/ジクロロメタン(8-20%, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、ガラス状固体としてヌクレオシド51を得た(440 mg, 92%)。

#### 【0416】

$\delta_{\text{H}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 8.12 (1H, br s, 8'-H), 5.86 (1H, s, 1'-H), 4.50 (1H, s, 2'-H), 4.30 (1H, s, 3'-H), 4.05 (1H, d, J 8.0, 1''-H<sub>a</sub>), 3.95 (2H, s, 5'-H), 3

.87 (1H, d, J 7.9, 1''-H<sub>a</sub>), 2.74 (1H, m, CHCO), 1.23 (6H, d, J 6.9, CH<sub>3</sub>C-H)。

#### 【0417】

$\delta_c$  (CD<sub>3</sub>OD, 炭水化物部分からのシグナル) 90.2, 87.6 (C-1', C-4'), 81.1 (C-3'), 72.9, 71.3 (C-2', C-5'), 58.2 (C-1''), 37.1 (COCH), 19.5 (CH<sub>3</sub>CH)。

#### 【0418】

FAB-MS m/z 366 [M+H]<sup>+</sup>。

#### 【0419】

#### 実施例54

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-(2-N-イソブチリルグアニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(52)。

化合物51 (440 mg, 1.21 mmol)と4,4'-ジメトキシトリチルクロライド (573 mg, 1.69 mmol)の混合物を無水ピリジン (7 cm<sup>3</sup>)に溶解し、室温で4時間攪拌した。混合物を減圧下で蒸発させて油を得た。ジクロロメタン/水系(1:1, v/v, 40 cm<sup>3</sup>)で抽出した。有機相を分離して濃縮し、0.5%のピリジン(v/v)を含む最小容量の溶液を得た。これを同一の溶媒で平衡させたシリカゲルクロマトグラフィに付した。生成物を0.5%のピリジン(v/v)を含むジクロロメタン中のメタノールの濃度勾配(0.6 - 2%, v/v)で溶出し、白色固体として化合物52を得た(695 mg, 86%)。

#### 【0420】

$\delta_h$  (CDCl<sub>3</sub>) 12.17 (1H, br s, NHCO), 10.09 (1H, br s, NH), 7.87 (1H, s, 8-H), 7.42-6.72 (13H, m, DMT), 5.69 (1H, s, 1'-H), 4.59 (1H, s, 2'-H), 4.50 (1H, s, 3'-H), 3.98 (1H, d, J 8.1, 1''-H<sub>a</sub>), 3.69-3.39 (9H, m, DMT, 5'-H, 1''-H<sub>b</sub>), 2.72 (1H, m, CHCO), 1.17 (6H, d, J 6.8, CH<sub>3</sub>CH)。

#### 【0421】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 179.8 (COCH), 158.8, 144.5, 135.6, 135.5, 130.1, 128.1, 127.7, 126.9, 113.2 (DMT), 155.8, 147.9, 147.5, 137.0, 120.8 (グアニン), 87.6, 86.4, 86.1 (C-1', C-4', DMT), 79.7 (C-3'), 72.6, 71.4 (C-2', C-5'), 59.8 (C-1''), 55.2 (DMT), 36.1 (COCH), 19.1, 18.8 (CH<sub>3</sub>CH)。

## 【0422】

FAB-MS  $m/z$  668 [M+H]<sup>+</sup>。

## 【0423】

## 実施例55

(1R,3R,4R,7S)-7-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(2-N-イソプロピオニルグアニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(53)。

## 【0424】

化合物52 (670 mg, 1.0 mmol) を室温でN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.38 cm<sup>3</sup>, 4 mmol)を含む無水ジクロロメタン(5 cm<sup>3</sup>)に溶解した。2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.36 cm<sup>3</sup>, 2.0 mmol)を攪拌しながら滴加した。5時間後、メタノール(2 cm<sup>3</sup>)を加え、混合物をジクロロメタンを加えて100 cm<sup>3</sup>に希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(50 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を分離し、溶媒を減圧下で蒸発させて除去した。残渣を0.5%のピリジン(v/v)を含むジクロロメタン/石油エーテルの最小容量(1:1, v/v)に溶解し、同一の溶媒混合物で平衡させたシリカゲルを充填したカラムに付した。カラムをジクロロメタン/石油/ピリジン(75:25:0.5, v/v/v, 250 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、生成物を0.5%のピリジン(v/v)を含むジクロロメタン(0-1%, v/v)中のメタノール勾配を使用して溶出した。主生成物を含む画分を蒸発させ、トルエンと共に蒸発させた。残渣を無水ジクロロメタン(5 cm<sup>3</sup>)に溶解し、石油エーテル(100 cm<sup>3</sup>)から析出し、濾過および乾燥後、白色固体として化合物53を得た(558 mg, 64%)。

## 【0425】

$\delta$ , ( $\text{CDCl}_3$ ) 148.17, 146.07. FAB-MS  $m/z$  868 [M+1]<sup>+</sup>。

## 【0426】

## 実施例56

1-(2-O-アセチル-4-C-アセトキシメチル-3,5-ジ-O-ベンジル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-4-N-ベンゾイルシトシン(54)。

アノマー混合物33 (4.0 g, 8.22 mmol)と4-N-ベンゾイルシトシン(2.79 g, 13.0 mmol)の攪拌溶液にN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(8.16 cm<sup>3</sup>, 33.0

mmol)を加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌し、0℃に冷却した。トリメチルシリルトリフレート(3.0 cm<sup>3</sup>, 16.2 mmol)を滴加し、混合物を60℃で2時間攪拌した。炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 20 cm<sup>3</sup>)およびブライン(2 × 20 cm<sup>3</sup>)を連続的に加え、分離した有機相を乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として化合物54を得た(3.9 g, 74%)。

## 【0427】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.28 (1H, d, J 7.5, 6-H), 7.94–7.90 (2H, m, Bz), 7.65–7.25 (13H, m, Bn, Bz), 7.16 (1H, d, J 7.1, 5-H), 6.22 (1H, d, J 2.8, 1'-H), 5.51 (1H, dd, J 2.8, 5.8, 2'-H), 4.62 (1H, d, J 11.6, Bn), 4.51 (1H, d, J 12.3, 1''-H<sub>a</sub>), 4.49–4.34 (4H, m, 3'-H, Bn), 4.21 (1H, d, J 12.3, 1''-H<sub>b</sub>), 3.85 (1H, d, J 10.3, 5'-H<sub>a</sub>), 3.47 (1H, d, J 10.3, 5'-H<sub>b</sub>), 2.13 (3H, s, COCH<sub>3</sub>), 2.06 (3H, s, COCH<sub>3</sub>).

## 【0428】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 170.52, 169.61 (C=O), 166.83, 162.27 (C-4, C=O), 154.26 (C-2), 145.26 (C-6), 137.25, 136.93, 133.18, 129.0, 128.75, 128.51, 128.45, 128.18, 128.10, 127.89, 127.71 (Bn, Bz), 96.58 (C-5), 89.42, 86.52 (C-1', C-4'), 76.21, 75.10, 74.17, 73.70, 69.70, 63.97 (C-2', C-3', Bn, C-5', C-1''), 20.82 (COCH<sub>3</sub>)。

## 【0429】

FAB-MS m/z 664 [M+Na]<sup>+</sup>, 642 [M+H]<sup>+</sup>.

実測値: C, 65.0; H, 5.7, N, 6.5; C<sub>35</sub>H<sub>35</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>の理論値C, 65.5; H, 5.5; N, 6.5%.

## 【0430】

## 実施例57

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル- $\beta$ -D-リボフラノシル)-4-N-ベンゾイルシトシン(55)。

メタノール(20 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド54(3.4 g, 5.3 mmol)の攪拌溶液にナトリウムメトキシド(0.663 g, 11.66 mmol)を加えた。反応混合物を室温で10分間攪

拌し、次いで20%水性塩酸で中和した。溶媒を部分的に蒸発させ、残渣をジクロロメタン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 20 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(98.5:1.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として化合物55を得た(1.6 g, 54%)。

## 【0431】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 9.95 (1H, br s, NH), 8.33 (1H, d, J 7.4, 6-H), 7.98 (2H, m, Bz), 7.60–7.12 (14H, m, Bn, Bz, 5-H), 6.17 (1H, d, J 1.6, 1'-H), 4.78 (1H, d, J 11.8, Bn), 4.48–4.27 (5H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 3.85 (1H, d, J 11.8, 5'-H<sub>b</sub>), 3.66–3.61 (2H, m, 5'-H<sub>b</sub>, 1''-H<sub>a</sub>), 3.47 (1H, d, J 10.4, 1''-H<sub>b</sub>)。

## 【0432】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 167.5, 162.31 (C-4, C=O), 155.36 (C-2), 145.34 (C-6), 137.49, 137.08, 133.09, 133.01, 128.94, 128.67, 128.48, 128.30, 128.01, 127.90, 127.80 (Bn, Bz), 96.53 (C-5), 93.97, 89.35 (C-1', C-4'), 76.06, 75.28, 73.70, 72.76, 70.26, 62.44 (C-2', C-3', Bn, C-5', C-1'')。

## 【0433】

FAB-MS m/z 558 [M+H]<sup>+</sup>。

## 【0434】

## 実施例58

## 中間生成物56。

無水テトラヒドロフラン(60 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド55溶液(2.2 g, 3.94 mmol)を-20°Cで攪拌し、鉱油中の60%水素化ナトリウム懸濁液(w/w, 0.252 g, 6.30 mmol)を45分で7回に分けて加えた。溶液を-20°Cで15分間攪拌し、次いで塩化p-トルエンスルホニル(0.901 g, 4.73 mmol)を少量ずつ加えた。溶液を-20°Cで4時間攪拌した。さらに水素化ナトリウム(0.252 g, 6.30 mmol)および塩化p-トルエンスルホニル(0.751 g, 3.93 mmol)を加えた。反応混合物を48時間-20°Cに維持した。反応を氷冷水(50 cm<sup>3</sup>)を加えて失活させ、ジクロロメタン(3 × 60 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 20 cm<sup>3</sup>)で洗浄し

、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、中間生成物56(1.80 g)を得た。

### 【0435】

#### 実施例59

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-(4-N-ベンゾイルシトシン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(57)。

中間生成物56(1.80 g)を無水DMF(30.0 cm<sup>3</sup>)に溶解し、鉱油中の60%水素化ナトリウム懸濁液(w/w, 0.16 g, 3.9 mmol)を0°Cで30分間で5回に分けて加えた。反応混合物を室温で36時間攪拌した。反応を氷冷水(70 cm<sup>3</sup>)を加えて失活させ、得られた混合物をジクロロメタン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 30 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタノール(99.5:0.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として化合物57を得た(1.08 g, 79%)。

### 【0436】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.95 (1H, br s, NH), 8.20 (1H, d,  $J$  7.5, 6-H), 7.95–7.92 (2H, m, Bz), 7.66–7.22 (14H, m, Bn, Bz, 5-H), 5.78 (1H, s, 1'-H), 4.70–4.65 (3H, m, 2'-H, Bn), 4.60 (1H, d,  $J$  11.6, Bn), 4.47 (1H, d,  $J$  11.6, Bn), 4.05–3.78 (5H, m, 3'-H, 5'-H<sub>a</sub>, 1''-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 1''-H<sub>b</sub>)。

### 【0437】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 167.0, 162.36 (C-4, C=O), 154.5 (C-2), 144.58 (C-6), 137.46, 136.93, 133.35, 132.93, 129.11, 128.67, 128.50, 128.16, 128.11, 127.68, 127.60 (Bn), 96.35 (C-5), 88.38, 87.67 (C-1', C-4'), 76.14, 75.70, 73.79, 72.27, 72.09, 64.34 (Bn, C-5', C-1'', C-2', C-3').

### 【0438】

FAB-MS  $m/z$  540 [M+H]<sup>+</sup>。

実測値: C, 68.0; H, 5.5, N, 7.5;  $C_{31}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_6$  の理論値C, 69.0; H, 5.4; N, 7.8%。

## 【0439】

## 実施例60

(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(シトシン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(57A)。

無水メタノール(22 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド57溶液(0.3 g, 0.55 mmol)に1,4-シクロヘキサジエン(5.0 cm<sup>3</sup>)および炭素上の10%パラジウム(0.314 g)を加えた。混合物を還流させながら18時間攪拌した。炭素上の10%パラジウム(0.380 g)および1,4-シクロヘキサジエン(5.5 cm<sup>3</sup>)をさらに加え、混合物を54時間還流させた。反応混合物をシリカゲルパッドで濾過し、次いでメタノール(1500 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。合わせた濾液を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(9:2.5:7.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として化合物57Aを得た(0.051 g, 36%)。

## 【0440】

$\delta_{\text{H}}$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 7.73 (1H, d, J 7.7, 6-H), 7.12-7.20 (2H, br s, NH<sub>2</sub>), 5.74 (1H, d, J 7.7, 5-H), 5.61 (1H, br s, 3'-OH), 5.39 (1H, s, 1' -H), 5.12 (1H, m, 5'-OH), 4.08 (1H, s, 2'-H), 3.80 (1H, d, J 7.7, 1''-H<sub>a</sub>), 3.81 (1H, s, 3'-H), 3.74 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>), 3.63 (1H, d, J 7.7, 1''-H<sub>b</sub>)。

## 【0441】

$\delta_{\text{C}}$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 165.66 (C-4), 154.58 (C-2), 139.68 (C-6), 93.19 (C-5), 88.42, 86.73 (C-1', C-4'), 78.87, 70.85, 68.32, 56.04 (C-2', C-1'', C-3', C-5')。

## 【0442】

FAB-MS m/z 256 [M+H]<sup>+</sup>。

## 【0443】

## 実施例61

中間生成物57B。

無水ピリジン(2.0 cm<sup>3</sup>)中に懸濁したヌクレオシド57A(0.030 g, 0.11 mmol)に塩化トリメチルシリル(0.14 cm<sup>3</sup>, 1.17 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。塩化ベンゾイル(0.07 cm<sup>3</sup>, 0.58 mmol)を0°Cで加え、混合物を室温で2時間攪拌し

た。反応混合物を0℃に冷却した後、水(3.0 cm<sup>3</sup>)を加えた。5分間攪拌した後、アンモニア水溶液(1.5 cm<sup>3</sup>, 32%, w/w)を加え、室温で30分間攪拌した。混合物を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(97.5:2.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として中間生成物57Bを得た(0.062 g)。

#### 【0444】

##### 実施例62

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-7-ヒドロキシ-3-(4-N-ベンゾイルシトシン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(57C)。

無水ピリジン(1.5 cm<sup>3</sup>)の中の中間生成物57B溶液(0.042 g, 0.11 mmol)に4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(0.06 g, 0.17 mmol)を加えた。反応混合物を室温で3.5時間攪拌し、0℃に冷却し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(20 cm<sup>3</sup>)を加えた。ジクロロメタン(3 × 10 cm<sup>3</sup>)を用いて抽出した。合わせた有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発乾固させた。残渣をジクロロメタン/メタノール/ピリジン(98.0:1.5:0.5, v/v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド57Cを得た(0.031g, 57Aから~63%)。

#### 【0445】

$\delta_{\text{H}}$  (C, D, N) 12.32 (1H, br s, NHCO), 8.75–7.06 (20H, m, DMT, Bz, H-5, H-6), 6.24 (1H, s, 1'-H), 5.11 (1H, s, 2'-H), 4.90 (1H, s, 3'-H), 4.38 (1H, d, J 7.6, 1''-H<sub>a</sub>), 4.10 (1H, d, J 7.6, 1''-H<sub>b</sub>), 4.02 (1H, d, J 10.6, 5'-H<sub>a</sub>), 3.87 (1H, d, J 10.6, 5'-H<sub>b</sub>), 3.77, 3.76 (2 × 3H, 2 × s, 2 × OCH<sub>3</sub>)

。

#### 【0446】

$\delta_{\text{C}}$  (C, D, N) 169.00 (NHCO), 164.24 (C-2), 159.39 (DMT), 150.5, 145.62 (DMT), 144.31, 132.89, 130.82, 130.72, 129.09, 128.89, 128.60, 113.96 (DMT), 96.96, 89.01, 87.18, 79.91, 72.56, 70.25 (C-5, C-1', C-4', C-2', C-1'', C-3'), 59.51 (C-5'), 55.33 (OCH<sub>3</sub>).

#### 【0447】

FAB-MS m/z 662 [M+H]<sup>+</sup>。

## 【0448】

## 実施例63

(1R,3R,4R,7S)-7-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(4-N-ベンゾイルシトシン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(57D)。

無水ジクロロメタン(1.5 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド57C溶液(0.025 g, 0.03 mmol)にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.03 cm<sup>3</sup>, 0.17 mmol)を加え、次いで2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.02 cm<sup>3</sup>, 0.09 mmol)を滴加した。室温で5時間攪拌した後、反応混合物を0°Cに冷却し、ジクロロメタン/ピリジン(10.0 cm<sup>3</sup>, 99.5:0.5, v/v)を加え、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 8 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を分離し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発固化させた。残渣をジクロロメタン/メタノール/ピリジン(99.0:0.5:0.5, v/v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、薄黄色の油としてアミダイト57Dを得た(0.038 g)。

## 【0449】

$\delta_p$  (CDCl<sub>3</sub>) 147.93。

## 【0450】

## 実施例64

9-(2-O-アセチル-4-C-アセチルオキシメチル-3,5-ジ-O-ベンジル- $\beta$ -D-1)ボフラノシル)-6-N-ベンゾイルアデニン(58)。

無水ジクロロメタン(200 cm<sup>3</sup>)中のアノマー混合物33(5.0 g, 10.3 mmol)と6-N-ベンゾイルアデニン(3.76 g, 15.7 mmol)の攪拌懸濁液にN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(15.54 cm<sup>3</sup>, 61.8 mmol)を加えた。反応混合物を還流せながら1時間攪拌し、次いで室温に冷却した。トリメチルシリルトリフレート(7.0 cm<sup>3</sup>, 38.7 mmol)を滴加し、混合物を20時間還流させた。反応混合物を室温に冷却し、混合物の容量を減圧下で1/4に減らした。ジクロロメタン(250 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 50 cm<sup>3</sup>)および水(50 cm<sup>3</sup>)で洗浄した。有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(99.5:0.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィ

で精製し、白色固体としてヌクレオシド58を得た(3.65 g, 52%)。

#### 【0451】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.25 (1H, br s, NH), 8.71 (1H, s, 8-H), 8.24 (1H, s, 2-H), 8.0 (2H, d, J 7.5, Bz), 7.60–7.23 (13H, m, Bn, Bz), 6.35 (1H, d, J 4.6, 1'-H), 5.99 (1H, dd, J 4.9, 5.3, 2'-H), 4.78 (1H, d, J 5.6, 3'-H), 4.64–4.42 (5H, m, Bn, 1''-H<sub>a</sub>), 4.25 (1H, d, J 12.1, 1''-H<sub>b</sub>), 3.72 (1H, d, J 10.1, 5'-H<sub>a</sub>), 3.56 (1H, d, J 10.1, 5'-H<sub>b</sub>), 2.07 (3H, s,  $\text{COCH}_3$ ), 2.02 (3H, s,  $\text{COCH}_3$ )。

#### 【0452】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 170.42, 169.72 ( $\text{COCH}_3$ ), 164.60 (NHCO), 152.51 (C-6), 151.45 (C-2), 149.46 (C-4), 141.88 (C-8), 137.04, 137.00, 133.50, 132.60, 128.86, 128.66, 128.53, 128.41, 128.38, 128.18, 128.06, 127.91, 127.88, 127.79, 127.63, 123.26 (Bz, Bn, C-5), 86.38 (C-1'), 86.25 (C-4'), 77.74, 74.74, 74.44, 73.48 (C-2', C-3', 2 × Bn), 70.11 (C-1''), 63.42 (C-5'), 20.70, 20.54 ( $\text{COCH}_3$ )。

#### 【0453】

FAB-MS  $m/z$  666 [M+H]<sup>+</sup>。

#### 【0454】

#### 実施例65

9-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-6-N-ベンゾイルアデニン(59)。

メタノール(50 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド58 (4.18 g, 6.28 mmol)の攪拌溶液にナトリウムメトキシド(0.75 g, 13.8 mmol)を0°Cで加えた。反応混合物を2時間攪拌し、水を加えた。混合物を20%HCl水溶液で中和した。ジクロロメタン(3 × 75 cm<sup>3</sup>)で抽出し、有機相を分離し、乾燥し( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(98.5:1.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体として化合物59を得た(2.68 g, 73%)。

#### 【0455】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.42 (1H, br s, NH), 8.58 (1H, s, H-8), 8.16 (1H, s, 2-H), 7

.96 (2H, d,  $\int$  7.2, Bz), 7.52–7.08 (13H, m, Bn, Bz), 6.18 (1H, d,  $\int$  2.5, 1'-H), 4.85–4.38 (4H, m, Bn, 2'-H, 3'-H), 4.33 (2H, s, Bn) 3.90 (1H, d,  $\int$  11.9, 1''-H<sub>a</sub>), 3.71 (1H, d,  $\int$  11.8, 1''-H<sub>b</sub>), 3.50–3.39 (2H, m, 5-H)。

#### 【0456】

$\delta_c$  ( $CDCl_3$ ) 164.98 (NHCO), 152.19 (C-6), 151.00 (C-2), 149.34 (C-4), 142.28 (C-8), 137.32, 137.25, 133.46, 132.70, 128.69, 128.49, 128.40, 128.11, 128.03, 127.94, 127.83, 127.62, (Bz, Bn), 122.92 (C-5), 90.94, 88.75 (C-1', C-4'), 77.65, 74.08, 73.44, 73.20, 71.12, 62.39 (C-1'', C-5', C-2', C-3', 2 x Bn).

#### 【0457】

FAB-MS  $m/z$  582 [M+H]<sup>+</sup>。

実測値: C, 65.6; H, 5.5; N, 11.7;  $C_{12}H_{11}N_5O_6$  の理論値 C, 66.1; H, 5.4; N, 12.0%。

#### 【0458】

##### 実施例66

中間生成物60。

無水テトラヒドロフラン(25 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド59(2.43 g, 4.18 mmol)溶液を-20°Cで攪拌し、鉱油中60%水素化ナトリウム懸濁液(w/w, 0.28 g, 7.0 mmol)を30分間で4回に分けて加えた。1時間攪拌した後、塩化p-トルエンスルホニル(1.34 g, 7.0 mmol)を少量ずつ加えた。混合物を-10°Cで15時間攪拌した。氷冷水(50 cm<sup>3</sup>)を加え、ジクロロメタン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 25 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発した。残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、中間生成物60を得た(1.95 g)。

#### 【0459】

##### 実施例67

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-(6-N-ベンゾイルアデニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(61)。

中間生成物60 (1.90 g)を無水DMF (20 cm<sup>3</sup>)に溶解し、鉱油中の60%水素化ナト

リウム懸濁液(w/w, 0.16 g, 3.87 mmol)を0℃で少量ずつ加えた。混合物を室温で10時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮した。残渣をジクロロメタン(75 cm<sup>3</sup>)に溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 25 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、減圧下に蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド61を得た(1.0 g, ~44%、59より)。

## 【0460】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.71 (H, s, 8-H), 8.23 (1H, s, 2-H), 8.02 (2H, m, J 7.0, Bz), 7.99–7.19 (13H, m, Bn, Bz), 6.08 (1H, s, 1'-H), 4.78 (1H, s, 2'-H), 4.61–4.50 (4H, m, 2 × Bn), 4.24 (1H, s, 3'-H), 4.12 (1H, d, J 7.8, 1''-H<sub>a</sub>), 4.00 (1H, d, J 7.9, 1''-H<sub>b</sub>), 3.85–3.78 (2H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>)。

## 【0461】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 164.61 (NHCO), 152.32 (C-6), 150.61 (C-2), 149.35 (C-4), 140.67 (C-8), 137.24, 136.76, 133.33, 132.66, 128.68, 128.39, 128.29, 127.94, 127.77, 127.51 (Bn, Bz), 123.43 (C-5), 87.14, 86.52 (C-1', C-4'), 77.21, 76.77, 73.56, 72.57, 72.27, 64.65 (C-2', C-3', C-1'', 2 × Bn, C-5')。

## 【0462】

FAB-MS m/z 564 [M+H]<sup>+</sup>。

実測値: C, 66.2; H, 5.5; N, 11.4; C<sub>32</sub>H<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub> の理論値C, 66.2; H, 5.2; N, 12.4%。

## 【0463】

## 実施例68

(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(アデニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(61A)。

無水ジクロロメタン(30 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド61(0.80 g, 1.42 mmol)攪拌溶液にBCl<sub>3</sub> (ヘキサン中1 M溶液; 11.36 cm<sup>3</sup>, 11.36 mmol)を-78℃で30分かけて滴加した。混合物を-78℃で4時間攪拌し、さらにBCl<sub>3</sub> (ヘキサン中1 M溶液, 16.0 cm<sup>3</sup>, 16.0 mmol)を滴加し、混合物を-78℃で3時間攪拌した。次いで反応混合物の温度をゆっくりと室温まで上昇させ、30分間攪拌した。メタノール(25.0 cm<sup>3</sup>)を

-78℃で加え、混合物を室温で12時間攪拌した。混合物を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(92:8, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド61Aを得た(0.332 g, 84%)。

#### 【0464】

$\delta_{\text{H}}$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 8.22 (1H, s, 8-H), 8.15 (1H, s, 2-H), 7.33 (2H, s, NH<sub>2</sub>), 5.89 (1H, s, 1'-H), 5.83 (1H, d, J 4.2, 3'-OH), 5.14 (1H, t, J 5.9, 5'-O H), 4.14 (1H, s, 2'-H), 4.25 (1H, d, J 4.2, 3'-H), 3.92 (1H, d, J 7.8, 1''-Ha), 3.81-3.41 (3H, m, 5'-H<sub>a</sub>, 5'-H<sub>b</sub>, 1''-H<sub>b</sub>)。

#### 【0465】

$\delta_{\text{C}}$  ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO) 155.90 (C-6), 152.64 (C-2), 148.35 (C-4), 137.72 (C-8), 118.94 (C-5), 88.48, 85.17 (C-1', C-4'), 79.09, 71.34, 69.83, 56.51 (C-2', C-3', C-1'', C-5')。

#### 【0466】

FAB-MS m/z 280 [M+H]<sup>+</sup>。

#### 【0467】

#### 実施例69

(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(6-N-ベンゾイルアデニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(61B)。

無水ピリジン(1 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド61A (0.32 g, 1.15 mmol)の攪拌溶液に塩化トリメチルシリル(0.73 cm<sup>3</sup>, 5.73 mmol)を加え、混合物を室温で20分間攪拌した。塩化ベンゾイル(0.67 cm<sup>3</sup>, 5.73 mmol)を0℃で加え、反応混合物を室温で2時間攪拌した。反応混合物を0℃に冷却し、氷冷水(15.0 cm<sup>3</sup>)を加えた。5分間攪拌した後、32%(w/w)アンモニア水溶液(1.5 cm<sup>3</sup>)を加え、混合物を30分間攪拌した。混合物を蒸発乾固させ、残渣を水(25 cm<sup>3</sup>)に溶解した。減圧下で混合物を蒸発させた後、残渣をジクロロメタン/メタノール(97:3, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド61Bを得た(0.55 g)。

#### 【0468】

FAB-MS  $m/z$  384 [M+H]<sup>+</sup>。

【0469】

実施例70

(1R,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(6-N-ベンゾイルアデニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(61C)。

無水ピリジン(20 cm<sup>3</sup>)中の化合物61B(0.50 g)の攪拌溶液に4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(0.71 g, 2.09 mmol)および4-N,N-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(0.1 g)を加えた。室温で2時間、50°Cで1時間攪拌した後、反応混合物を0°Cに冷却し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(100 cm<sup>3</sup>)を加えた。ジクロロメタン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した後、合わせた有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール/ピリジン(98.0:1.5:0.5)で溶出させてシリカゲルクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド61Cを得た(0.36 g, 61Aから、~50%)。

【0470】

$\delta_{\text{H}}$  (C<sub>6</sub>D<sub>5</sub>N) 12.52 (NHCO), 9.10 (2H, d,  $J$  7.7, Bz), 8.88 (1H, s, 8-H), 8.50-7.11 (17H, m, DMT, Bz, 2-H), 6.65 (1H, s, H-1'), 5.25 (2H, s, H-2', H-3'), 4.71 (1H, d,  $J$  7.8, 1''-H<sub>a</sub>), 4.56 (1H, d,  $J$  7.8, 1''-H<sub>b</sub>), 4.20 (1H, d,  $J$  10.8, 5'-H<sub>a</sub>), 4.07 (1H, d,  $J$  10.8, 5'-H<sub>b</sub>), 3.82, 3.81 (2 × 3H, 2 × s, 2 × OCH<sub>3</sub>)。

【0471】

$\delta_{\text{C}}$  (C<sub>6</sub>D<sub>5</sub>N) 167.56 (NHCO), 159.24 (C-6), 152.50, 152.08, 151.81, 145.84, 141.45, 136.52, 136.28, 132.55, 130.76, 130.70, 129.32, 128.85, 128.76, 128.46, 127.38, 126.33 (DMT, Bz, C-2, C-4, C-8), 113.84 (C-5), 88.64, 87.20, 86.85, 80.52, 73.13, 72.16, 60.86 (C-1', C-4', DMT, C-2', C-3', C-1'', C-5'), 55.24 (OCH<sub>3</sub>)。

【0472】

FAB-MS  $m/z$  686 [M+H]<sup>+</sup>。

実測値: C, 68.3; H, 5.0; N, 9.7; C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>7</sub> の理論値 C, 68.3; H, 5.1; N, 10.2%。

## 【0473】

## 実施例71

(1R,3R,4R,7S)-7-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(6-N-ベンゾイルアデニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(61D)。

無水ジクロロメタン(1.5 cm<sup>3</sup>)中の化合物61C(190 mg, 0.277 mmol)溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.16 cm<sup>3</sup>, 0.94 mmol)および2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.1 cm<sup>3</sup>, 0.42 mmol)を0°Cで加えた。混合物を室温に温め、5時間攪拌した。溶液をジクロロメタン(50 cm<sup>3</sup>)で希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 30 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、減圧下で蒸発させた。生成物をシリカゲルHPLC(PrepPak カートリッジ, 25 × 100 mm, Prep Nova-Pak(商標) HR シリカでパックされている、6 μm 60A; 溶液A中の溶液B勾配(25分で0%~15%、さらに25分で15%~100%，溶液A: 石油/ジクロロメタン/ピリジン，60/39.6/0.4, v/v/v, 溶液B: 酢酸エチル)で分離した。2つの主生成物を含む画分(維持時間 30~40分)を結合し、減圧下で濃縮し、無水トルエン(2 × 40 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させ、真空中で一晩乾燥した。残渣を無水ジクロロメタン(4 cm<sup>3</sup>)に溶解し、この溶液を激しく攪拌しながら無水石油エーテル(80 cm<sup>3</sup>)に加えることにより析出した。析出物を濾過によって回収し、石油エーテル(2 × 20 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、減圧下で乾燥し、白色固体として化合物61Dを得た(178 mg, 73%)。

## 【0474】

δ<sub>D</sub> (CD<sub>3</sub>CN) 148.42, 147.93。

## 【0475】

## 実施例72

1-(2,3-O-イソプロピリデン-4-C-(4-トルエンスルホニルオキシメチル)-β-D-1)ボフラノシル)ウリジン(62)。

無水ピリジン(28 cm<sup>3</sup>)中の1-(2,3-O-イソプロピリデン-4'-C-ヒドロキシメチル-β-D-リボフラノシル)ウリジン(2.0 g, 6.4 mmol)(R. Youssefeyeh, D. Tegg, J. P. H. Verheyden, G. H. Jones および J. G. Moffat, Tetrahedron Lett., 1977, 5, 435; G. H. Jones, M. Taniguchi, D. Tegg および J. G. Moffat, J.

Org. Chem., 1979, 44, 1309)の攪拌溶液に無水ビリジン(10 cm<sup>3</sup>)に溶解した塩化p-トルエンスルホニル(1.46 g, 7.3 mmol)を-30℃で加えた。30分後、反応混合物を室温に到達させ、室温で12時間攪拌した。反応をメタノール(4 cm<sup>3</sup>)で失活させ、シリカゲル(2g)を加え、溶媒を減圧下で除去した。残渣をジクロロメタン(v/v)中の0-3%メタノール勾配を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、薄赤色の固体物としてヌクレオシド62を得た(1.8 g, 60%)。

## 【0476】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 9.80 (1H, br s, NH), 7.80 (2H, d, J 8.3, Ts), 7.46 (1H, d, J 8.1, 6-H), 7.35 (2H, d, J 8.01, Ts), 5.72 (1H, d, J 8.0, 5-H), 5.54 (1H, d, J 3.5, 1'-H), 5.08 (1H, dd, J 3.5, 6.4, 2'-H), 4.94 (1H, d, J 6.4, 3'-H), 4.18 (2H, s, 1''-H), 3.82-3.70 (2H, m, 5'-H), 2.45 (3H, s, Ts), 1.46, 1.29 (6 H, s, CH<sub>3</sub>)。

## 【0477】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.6 (C-4), 150.4 (C-2), 145.2 (C-6), 142.9, 132.5, 129.9, 128.0 (Ts), 114.7 (OCO), 102.6 (C-5), 94.9, 87.6, 83.9, 81.5 (C-4', C-1', C-3', C-2'), 68.7, 63.5 (C-1'', C-5''), 26.4, 24.7 (CH<sub>3</sub>), 21.7 (Ts)。

## 【0478】

FAB-MS m/z 469 [M+H]<sup>+</sup>。

## 【0479】

## 実施例73

1-(4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル- $\beta$ -D-リボフラノシル)ウリジン(63)。

ヌクレオシド62 (1.33 g, 2.83 mmol)を80%酢酸(25 cm<sup>3</sup>)に溶解し、80℃で3時間攪拌し、溶媒を減圧下で除去した。残渣をエタノール(10 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させ、ジクロロメタン(v/v)中の0-2%メタノール勾配を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体物としてヌクレオシド63を得た(391 mg, 33%)。

## 【0480】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 7.81 (1H, d,  $J$  8.1, 6-H), 7.77 (1H, d,  $J$  8.4, Ts), 7.40 (2H, d,  $J$  8.6, Ts), 5.74 (1H, d,  $J$  6.6, 1'-H), 5.69 (1H, d,  $J$  8.1, 5-H), 4.1 7-4.33 (2H, m, 2'-H, 3'-H), 3.67-3.62 (2H, m, 1''-H), 3.26-3.20 (2H, m, 5'-H), 2.43 (3H, s, Ts)。

## 【0481】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 166.0 (C-4), 153.0 (C-2), 146.5 (C-6), 142.5, 130.9, 129.15 (Ts), 103.1 (C-5), 89.0, 87.2 (C-1', C-4'), 75.1, 72.7, 71.3, 63.8 (C-1', C-3', C-2', C-5'), 21.6 (Ts)。

## 【0482】

## 実施例74

(1S,3R,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(ウラシル-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(44)。

無水DMF( $2 \text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド63 (64 mg, 0.14 mmol)の攪拌溶液に無水DMF( $2 \text{ cm}^3$ )中の水素化ナトリウム (8.4 mg, 21 mmol, 鉛油中の60%懸濁液、w/w)を0°Cでゆっくりと加えた。反応混合物を120°Cで6時間熱した。反応を水( $2 \text{ cm}^3$ )で失活させた後、溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン(v/v)中の5-7%メタノール勾配を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体として化合物44を得た(9 mg, 29%)。NMRデータは化合物44について報告されたものと一致した。

## 【0483】

## 実施例75

(1S,3R,4R,7S)-7-アセトキシ-1-アセトキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(64)。

無水ピリジン( $2.5 \text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド37 (209.8 mg, 0.78 mmol)の攪拌溶液に無水酢酸( $0.3 \text{ cm}^3$ , 3.23 mmol)および触媒量のDMAP (5 mg)を加えた。2時間攪拌した後、エタノール( $4 \text{ cm}^3$ )を加え、混合物を減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタンに再び溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $7 \text{ cm}^3$ )で洗浄した。有機相を乾燥し( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(97:3, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで

精製し、白色固形物として64を得た(249 mg, 9%)。

【0484】

$\delta_c$  ( $CDCl_3$ ) 169.59, 163.20, 149.50, 133.55, 110.64, 87.05, 85.38, 77.84, 71.70, 71.02, 58.60, 20.62, 20.53, 12.78.

FAB-MS  $m/z$  355 [M+H]<sup>+</sup>。

【0485】

実施例76

(1S,3R,4R,7S)-1-ヒドロキシメチル-3-(5-メチル-4-N-ベンゾイルシトシン-1-イル)-7-ヒドロキシ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(65)。

無水アセトニトリル( $3\text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド64 (232.7 mg, 0.66 mmol)の溶液に無水アセトニトリル( $5\text{ cm}^3$ )中の1,2,4-トリアゾール(420 mg, 6.1 mmol)およびPOCl<sub>3</sub> ( $0.12\text{ cm}^3$ , 1.3 mmol)の溶液を加えた。反応混合物を0°Cに冷却し、無水トリエチルアミン( $0.83\text{ cm}^3$ )を加え、混合物を室温で90分間維持した。トリエチルアミン( $0.54\text{ cm}^3$ )および水( $0.14\text{ cm}^3$ )を加え、反応混合物を10分間攪拌し、減圧下で蒸発させた。残渣をEtOAcに溶解し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $2 \times 9\text{ cm}^3$ )および水( $9\text{ cm}^3$ )で洗浄した。水相をジクロロメタン( $3 \times 20\text{ cm}^3$ )で抽出し、合わせた有機相を減圧下で蒸発させ、残渣をジオキサン( $4\text{ cm}^3$ )に再び溶解し、32% アンモニア水 ( $0.7\text{ cm}^3$ )を加えた。3時間攪拌した後、反応混合物を減圧下で蒸発させ、無水ピリジンと共に蒸発させた。残渣を無水ピリジン( $3.6\text{ cm}^3$ )に溶解し、塩化ベンゾイル( $0.42\text{ cm}^3$ , 3.6 mmol)を加えた。2時間攪拌した後、反応を水( $1\text{ cm}^3$ )で失活させ、反応混合物を減圧下で蒸発させた。次いで残渣をEtOAcに再び溶解し、水( $3 \times 7\text{ cm}^3$ )で洗浄した。有機相を減圧下で蒸発乾固させ、残渣をピリジン/メタノール/水(13:6:1, v/v/v,  $14\text{ cm}^3$ )に0°Cで溶解し、ピリジン/メタノール/水(13:6:1, v/v/v,  $7\text{ cm}^3$ )中のNaOHの2M溶液を加えた。20分間攪拌した後、反応混合物をジオキサン中のHClの2M溶液で中和し、反応混合物を減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(95:5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、黄色の発泡体としてヌクレオシド65を得た(94.6 mg, 38%)。

【0486】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) 8.21 (1H, br, s), 8.02 (1H, m), 7.84–7.9 (1H, m), 7.41–7.58 (4H, m), 5.61 (1H, s), 4.36 (1H, s), 4.10 (1H, s), 3.98 (1H, d,  $J$  8.0), 3.94 (2H, s), 3.78 (1H, d,  $J$  7.9), 2.11 (3H, d,  $J$  1.0)。 $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 選択されたシグナル) 133.66, 132.90, 130.63, 129.50, 129.28, 128.65, 90.71, 88.86, 80.57, 72.47, 70.22, 57.53, 14.01.

FAB-MS  $m/z$  374 [ $\text{M}+\text{H}]^+$ 。

### 【0487】

#### 実施例77

(1R,3R,4R,7S)-1-(4,4'-ジメトキシトリチルオキシメチル)-3-(5-メチル-4-N-ベンゾイルシトシン-1-イル)-7-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノキシ)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(66)。

無水ピリジン( $1.5 \text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド65 (82 mg, 0.22 mmol)の攪拌溶液に4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(80 mg, 0.24 mmol)を加え、室温で12時間攪拌した。4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(80 mg, 0.24 mmol)をさらに加え、攪拌をさらに12時間継続した。メタノール( $0.5 \text{ cm}^3$ )を加え、反応混合物を減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール/ピリジン(98.5:1.0:0.5, v/v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付した。得られた中間生成物(FAB-MS  $m/z$  676) (50.2 mg)を無水アセトニトリルと共に蒸発させ、無水ジクロロメタン ( $0.62 \text{ cm}^3$ )に溶解した。 $N,N$ -ジイソプロピルエチルアミンを加え( $0.1 \text{ cm}^3$ )、次いで2-シアノエチル $N,N$ -ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト( $0.3 \text{ cm}^3$ , 0.11 mmol)を加えた。室温で3時間攪拌した後、水( $1 \text{ cm}^3$ )を加え、得られた混合物を酢酸エチル( $10 \text{ cm}^3$ )で希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $3 \times 6 \text{ cm}^3$ )およびブライン( $3 \times 6 \text{ cm}^3$ )で洗浄した。有機相を乾燥し( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、減圧下で蒸発させた。残渣をシリカゲルカラムHPLCで精製した。化合物53について記載した析出により、白色固体として化合物66を得た(29.5 mg, 0.03 mmol, 14%)。

### 【0488】

$\delta_{\text{P}}$  ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) 148.46, 147.49。

### 【0489】

## 実施例78

9-(4-(ヒドロキシメチル)-2,3-O-イソプロピリデン- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-6-N-ベンゾイルアデニン(67)。

塩化オキサリル(0.93 mL, 10.75 mmol)およびジクロロメタン(25 mL)の混合物を-70°Cに冷却した。ジメチルスルホキシド(DMSO, 1.7 mL, 22 mmol)を激しく攪拌しながら滴加した。混合物を-70°Cで10分間攪拌し、ジメチルスルホキシド/ジクロロメタン(1:9 v/v, 20 mL)中の9-(2,3-O-イソプロピリデン- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-6-N-ベンゾイルアデニン(3.4 g, 8.27 mmol)の溶液を5分で加えた。混合物を-60°Cで30分間攪拌した。トリエチルアミン(7 mL, 50.3 mmol)を加え、混合物を室温まで温めた。溶液をジクロロメタン(50 mL)で希釈し、水(3 × 100 mL)で洗浄した。水の画分を100 mLのジクロロメタンでさらに洗浄した。有機相を濃縮して油状の塊とし、ジオキサン(50 mL)と共に蒸発させ、30 mLのジオキサンに再び溶解した。37%ホルムアルデヒド水溶液(2.95 mL, 33.4 mmol)およびNaOHの2M水溶液(8.26 mL)を加えた。混合物を室温で10分間攪拌し、0°Cに冷却した。水素化ホウ素ナトリウム(640 mg, 16.9 mmol)を加え、反応混合物を15分間で室温まで温めた。反応を酢酸(5 mL)を加えることによって失活させ、この混合物にジクロロメタンと炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(それぞれ100 mL)を加えた。有機相を水(100 mL)で洗浄し、真空中で濃縮し、生成物をジクロロメタン(v/v)中の2 - 3.2 %メタノールを溶出液としてカラム(2.5 × 25 cm)シリカゲルクロマトグラフィで分離した。白色固体として1.85 g (50.7 %)の化合物67を得た。

## 【0490】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.72 (1H, s), 8.14 (1H, s), 8.03-8.00 (2H, m), 7.60-7.57 (1H, m), 7.56-7.46 (2H, m), 6.00 (1H, d,  $J$ 4.9), 5.35 (1H, dd,  $J$ '5.8,  $J$ ''5.0), 5.13 (1H, d,  $J$ 5.8), 3.87-3.78 (4H, m), 1.65 (3H, s), 1.38 (3H, s)。 $\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.8, 152.2, 150.4, 150.2, 142.6, 133.3, 132.9, 128.8, 128.0, 124.1, 114.7, 93.3, 90.2, 83.8, 82.5, 65.3, 62.9, 27.3, 25.1.

## 【0491】

FAB-MS:  $m/z$  442 [ $M+\text{H}]^+$ , 464 [ $M+\text{Na}]^+$ 。

## 【0492】

67の別の合成方法。

無水ピリジン(250 mL)中の2',3'-O-イソプロピリデンアデノシン(15 g)の溶液に塩化トリメチルシリル(15.5 mL)を加えた。反応混合物を室温で20分間攪拌し、0°Cに冷却した。塩化ベンゾイル(17 mL)を滴加し、混合物を2~3時間室温に維持した。水(50 mL)および25%水酸化アンモニウム水溶液(100 mL)を加え、3時間攪拌した。次いで混合物を減圧下で濃縮し、トルエン(2 × 200 mL)とジクロロメタン(DCM)と共に蒸発させ、飽和炭酸水素ナトリウムを加えた。有機相を蒸発乾固させ、黄色の固体を得た。エタノールから再結晶することにより、白色固体の中間物質として12.5 g(約80%)を得た。乾燥DCM(120 mL)中の塩化オキサリル(4.68 mL)を-70°Cに冷却した。DMSO(8.5 mL)を激しく攪拌しながら加えた。その後(10分)、10% DMSO/DCM(100 mL)中の合成は上記に記載した中間生成物(17 g)の溶液を滴加した(20分)。30分で温度を-50°Cに上げ、次いで反応をトリエチルアミン(35 mL)で失活させた。この混合物にDCM(200 mL)を加え、水(3 × 200 mL)で洗浄した。中間生成物を真空中で濃縮し、ジオキサンと共に蒸発させ、ジオキサン(120 mL)に再び溶解した。ホルムアルデヒド(37%)および水酸化ナトリウムの2 M水溶液(40 mL)を加え、反応混合物を1時間攪拌した。混合物を酢酸(6 mL)およびDCM(400 mL)で中和し、飽和炭酸水素ナトリウム(400 mL)を加えた。有機相を濃縮した。生成物67をカラムクロマトグラフィ(シリカゲル、1.5 - 5.0%メタノール/DCM)で精製した。8.5 g(46%)の67を得た。データはこの実施例の最初に記載した。

### 【0493】

#### 実施例79

9-(2,3-O-イソプロピリデン-4-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノシル)-6-N-ベンゾイルアデニン(68)および9-(4-ヒドロキシメチル-2,3-O-イソプロピリデン-5-O-(p-トルエンスルホニル)- $\beta$ -D-リボフラノシル)-6-N-ベンゾイルアデニン。

化合物67(1.95 g, 4.42 mmol)と塩化p-トルエンスルホニル(1.26 g, 6.63 mmol)の混合物を10 mLの無水ピリジンに0°Cで溶解した。反応混合物を4時間攪拌し、次いでジクロロメタン(100 mL)で希釈し、水(2×100 mL)で洗浄し、減圧下で濃

縮した。その混合物のジクロロメタン中のメタノール(1-4%)勾配のシリカゲルカラム( $2.5 \times 20 \text{ cm}$ )クロマトグラフィで精製し、白色固体として出発材料67(360 mg, 18.5 %)および2つの構造アイソマー、すなわち68(極性の低いアイソマー; 971 mg, 36.7 %)と9-(4-ヒドロキシメチル-2,3-O-イソプロピリデン-5-O-(4'-トルエンスルホニル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-N6-ベンゾイルアデニン(極性の高いアイソマー; 352 mg, 13.1%)を分離した。

## 【0494】

68:  $\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.69 (1H, s), 8.11 (1H, s), 8.00 (2H, m), 7.79 (2H, m), 7.58-7.55 (1H, m), 7.50-7.46 (2H, m), 7.34-7.32 (2H, m), 5.88 (1H, d,  $J$  4.9), 5.35 (1H, dd,  $J$ '5.8,  $J$ ''5.0), 5.13 (1H, d,  $J$  5.8), 3.87-3.78 (4H, m), 1.65 (3H, s), 1.38 (3H, s)。

## 【0495】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.7, 152.0, 150.2, 150.1, 144.9, 142.5, 133.2, 132.7, 132.3, 129.6, 128.6, 127.9, 127.8, 123.9, 114.6, 93.1, 87.9, 83.4, 81.6, 68.3, 64.4, 27.1, 25.0, 21.5。

FAB-MS:  $m/z$  596 [ $M+\text{H}]^+$

## 【0496】

## 実施例80

9-(4-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-6-N-ベンゾイルアデニン(69)。

10 mLの90%トリフルオロ酢酸水溶液中の化合物68(940 mg, 1.58 mmol)の溶液を室温で30分間維持し、真空中で濃縮して油質の塊とした。メタノール( $2 \times 20 \text{ mL}$ )およびトルエン( $20 \text{ mL}$ )と共に蒸発させた後、混合物をジクロロメタン中のメタノール勾配(2-5.0%)を溶出液としたシリカカラム( $2 \times 25 \text{ cm}$ )クロマトグラフィで精製し、白色固体として化合物69を得た(825 mg, 94 %)。

## 【0497】

$\delta_{\text{H}}$ (メタノール-d<sub>4</sub>) 8.67 (1H, s), 8.53 (1H, s), 8.05 (2H, d,  $J$  7.7), 7.75 (2H, d,  $J$  8.2), 7.63 (1H, m), 7.53 (2H, m), 7.32 (2H, d,  $J$  8.0), 5.94 (1H, d,  $J$  7.1), 4.92 (1H, dd,  $J$ '7.1,  $J$ ''5.3), 4.41 (1H, d,  $J$  5.1), 4.38 (1H,

d, J10.2), 4.28 (1H, d, J10.2), 3.80 (1H, d, J12.0), 3.68 (1H, d, J12.0), 2.35 (3H, s).

### 【0498】

$\delta_c$  ( $\text{メタノール-d}_4$ ) 168.2, 152.9, 150.8, 151.2, 146.4, 144.9, 134.7, 134.1, 134.0, 130.8, 129.7, 129.4, 129.1, 125.1, 90.0, 88.4, 75.3, 73.1, 71.1, 64.2, 21.6.

FAB-MS: m/z 556 [M+H]<sup>+</sup>

### 【0499】

#### 実施例81

9-(4-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)-3,5-O-(テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)-6-N-ベンゾイルアデニン(70)。

無水ピリジン(7 mL)中の化合物69 (780 mg, 1.40 mmol)の溶液に1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン(500  $\mu\text{L}$ , 1.57 mmol)を0°Cで加えた。0°Cで2時間攪拌した後、1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン(50  $\mu\text{L}$ , 0.16 mmol)をさらに加えた。反応混合物を室温に温め、ジクロロメタン(100 mL)で希釈し、水(2 × 100 mL)で洗浄した。有機相を濃縮し、残渣を分取HPLC (PrepPak カートリッジ, Porasil 15–20  $\mu\text{m}$  125 Å; 溶出液: ジクロロメタン(v/v)中0–3%メタノール、120 分; 流量: 60 mL/分)を用いて精製した。真空中で濃縮し、白色固体として870 mg (78%)の化合物70を得た。

### 【0500】

$\delta_n$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.65 (1H, s), 8.03 (2H, m), 8.00 (1H, s), 7.83 (2H, d, J8.4), 7.58 (1H, m), 7.49 (2H, m), 7.34 (2H, d, J8.4), 5.87 (1H, s), 5.70 (1H, d, J6.2), 4.68 (1H, d, J6.2), 4.59 (1H, d, J10.8), 4.31 (1H, d, J11.0), 3.91 (2H, s), 2.45 (3H, s), 1.03–0.84 (28H, m).

### 【0501】

$\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.9, 152.2, 150.5, 150.0, 144.7, 142.9, 133.5, 132.9, 132.8, 129.7, 128.8, 128.1, 128.0, 123.6, 90.3, 85.3, 76.0, 75.0, 68.7, 65.2, 21.6, 17.5, 17.4, 17.2, 17.1, 17.0, 16.9, 13.1, 13.0, 12.5, 12.4.

FAB-MS: m/z 798 [M+H]<sup>+</sup>

## 【0502】

## 実施例82

9-(2-O,4-C-メチレン-3,5-O-(テトライソプロピルジシロキサ-1,3-ジイル)- $\beta$ -D-アリボフラノシリル)-6-N-ベンゾイルアデニン(71)。

無水THF(20 mL)中の化合物70(540 mg, 0.68 mmol)の溶液を0°Cに冷却し、水素化ナトリウム(鉱油中の60%懸濁液130 mg, 3.25 mmol)を攪拌しながら加えた。反応混合物を30分間攪拌し、次いで750  $\mu$ Lの酢酸を加えて中和した。ジクロロメタン(50 mL)を加え、混合物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 50 mL)で洗浄し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラム(2.5 × 25 cm)に付し、生成物をジクロロメタン中のメタノール濃度勾配(0.5 to 1.2 %)で溶出し、白色発泡体として化合物71を得た(356 mg, 84 %)。

## 【0503】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.77 (1H, s), 8.28 (1H, s), 8.03 (2H, m), 7.59 (1H, m), 7.50 (2H, m), 6.08 (1H, s), 4.86 (1H, s), 4.56 (1H, s), 4.14 (1H, d,  $J$ 13.2), 4.06 (1H, d,  $J$ 7.7), 3.97 (1H, d,  $J$ 13.2), 3.89 (1H, d,  $J$ 7.7), 1.12–0.95 (28H, m).

## 【0504】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.8, 152.6, 150.5, 149.6, 140.7, 133.6, 132.7, 128.7, 127.9, 123.1, 89.4, 86.5, 78.9, 71.7, 71.2, 56.7, 17.3, 17.1, 17.0, 16.9, 16.8, 13.3, 13.1, 12.5, 12.2.

FAB-MS:  $m/z$  626 [M+H]<sup>+</sup>

## 【0505】

## 実施例83

7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(6-N-ベンゾイルアデニン-9-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(61B)。

トリエチルアミン トリス-フッ化水素(300  $\mu$ L, 1.84 mmol)を無水THF(7 mL)中の化合物71(420 mg, 0.067 mmol)の溶液に加えた。反応混合物を室温で1時間維持し、濃縮して油とし、それをジクロロメタン(v/v)中4 – 10%メタノールで溶出しながらシリカゲルカラム(2 × 25 cm)クロマトグラフィで精製した。白色固

形物として 232 mg (92 %) の化合物 61B を得た。NMR データは先の 61B について報告されたものと同一である。

### 【0506】

#### 実施例84

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)-2-O-p-トルエ  
ンスルホニル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン (72)。

ジクロロメタン (20 ml) 中の 1-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-(ヒドロキシメチル)- $\beta$   
-D-リボフラノシリル)チミン 35 (1.48 g, 3.16 mmol)、DMAP (1.344 g, 0.011 mol)  
および塩化 p-トルエンスルホニル (1.45 g, 7.6 mmol) の溶液を室温で 3 時間攪拌  
した。反応混合物をジクロロメタン (30 ml) で希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和  
水溶液 (3 × 20 ml) および塩化ナトリウム (2 × 25 ml) で洗浄した。有機相を乾燥  
し ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、減圧下で濾過し、蒸発させた。残渣をメタノール:ジクロロメタン (1:99, v/v) を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、  
白色固体としてヌクレオシド 72 を得た (1.95 g, 80%)。

### 【0507】

FAB-MS m/e 776.

$\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 162.9, 149.8 (C-2, C-4), 145.8, 145.2 (2 × Ts), 136.9, 136.8  
(2 × Bn), 134.3 (C-6), 132.1, 132.0, 130.0, 129.9, 129.0 128.9, 128.4,  
128.3, 128.2, 128.0, 127.7 (2 × Ts, 2 × Bn), 111.2 (C-5), 85.3, 84.0 (C-  
1', C-4'), 78.9, 78.3, 75.2, 74.3, 72.7, 69.1 (C-2', C-3', C-5', C-1'',  
2 × Bn), 21.7 (2 ×  $\text{CH}_3$ ), 11.9 ( $\text{CH}_3$ ).

### 【0508】

$\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{S}_2\text{O}_{11}$  についての分析: C, 60.30; H, 5.19; N, 3.61. 実測値: C, 59.9  
5; H, 5.11, N 3.81.

### 【0509】

#### 実施例85

1-(2-ベンジルアミノ-2-デオキシ-3,5-ジ-0-ベンジル-2-N,4-C-メチレン- $\beta$ -D-  
リボフラノシリル)チミン (73)。

ベンジルアミン (10 ml) 中の 72 (8.6 g, 11.1 mol) の溶液を 130°C で 36 時間攪拌

した。反応混合物をメタノール:ジクロロメタン(1:99, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに直接付し、白色固体としてヌクレオシド73(1.79 g, 30%)を得た。

### 【0510】

FAB-MS m/e 540.

$\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 163.9, 149.8 (C-2, C-4), 139.2, 137.6, 137.3 (3  $\times$  Bn), 135.6 (C-6), 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.7, 127.0 (3  $\times$  Bn), 109.6 (C-5), 88.2, 86.3 (C-1', C-4'), 76.7, 73.8, 72.0, 66.0, 63.8, 57.9, 57.8 (C-2', C-3', C-5', C-1'', 3  $\times$  Bn), 12.2 ( $\text{CH}_3$ ).

### 【0511】

$C_{12}H_{21}N_3O_5 \times 0.5 H_2O$ についての分析: C, 70.06; H, 6.25; N, 7.66. 実測値: C, 70.00; H, 6.06; N, 7.50.

### 【0512】

#### 実施例86

1-(2-アミノ-2-デオキシ-2-N,4-C-メチレン- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(74)。

エタノール(150 ml)中のヌクレオシド73(1.62 g, 0.003 mol)の溶液に炭素上の20%水酸化パラジウム(3 g)およびその懸濁液を水素下で5日間攪拌した。触媒を濾過して除去し(シリカゲル)、メタノール(20 ml)で洗浄した。合わせた濾液を減圧下で濃縮し、白色固体を得、濾過して取り出し、メタノール:ジクロロメタン(1:4, v/v)で洗浄し、モノベンジル化中間生成物(0.82 g, 76%)を得た。

### 【0513】

FAB-MS: m/e 360 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

$^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ , 250 MHz): 163.7, 149.8 (C-2, C-4), 138.2 (Bn), 134.9 (C-6), 128.2, 127.5, 127.4 (Bn), 107.8 (C-5), 87.8, 87.6 (C-1', C-4'), 72.7, 68.9, 65.9, 61.7, 49.4 (C-2', C-3', C-5', C-1'', Bn), 11.9 ( $\text{CH}_3$ ).

### 【0514】

$C_{18}H_{21}N_3O_5$ についての分析: C, 60.16; H, 5.89; N, 11.69. 実測値: C, 59.86; H, 5.61; N, 11.56.

## 【0515】

無水メタノール(7 ml)中のこの中間生成物(0.1 g, 0.29 mmol), 嘌酸アンモニウム(0.085g, 1.35 mmol)および炭素上の10%パラジウム(130 mg)の混合物を還流させながら2時間加熱した。触媒を濾過して除去し(シリカゲル)、メタノール(15 ml)で洗浄し、合わせた濾液を減圧下で乾燥するまで濃縮した。残渣をメタノール:ジクロロメタン(1:9, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、白色固体として表題の化合物74を得た(0.053 g, 71%)。

## 【0516】

FAB-MS m/e 270.

$\delta_{\text{H}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 11.29 (bs, 1H, NH), 7.73 (d, 1H, J 1.1, 6-H), 5.31 (s, 1H, 1'-H), 5.29 (br s, 1H, 3'-OH), 5.13 (m, 1H, 5'-OH), 3.81 (s, 1H, 3'-H), 3.69 (m, 2H, 5'-H), 3.23 (s, 1H, 2'-H), 2.88 (d, 1H, J 9.8, 1''-H<sub>b</sub>), 2.55 (d, 1H, J 9.8, 1''-H<sub>b</sub>), 1.77 (d, 3H, J 0.8, CH<sub>3</sub>).

## 【0517】

$\delta_{\text{C}}$  (DMSO-d<sub>6</sub>) 164.0, 150.1 (C-2, C-4), 135.6 (C-6), 107.8 (C-5), 89.5, 87.9 (C-1', C-4'), 68.7, 61.9, 57.1, 49.4, (C-2', C-3', C-5', C-1'').

## 【0518】

C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> × 0.5 H<sub>2</sub>Oについての分析: C, 47.48; H, 5.80; N, 15.10. 実測値: C, 47.54; H, 5.30; N, 14.79.

## 【0519】

73から74への転換の別 の方法。

メタノール(6 ml)中の73(0.045 g, 0.0834 mmol)の溶液に炭素上の10%Pd(0.118 g)および、3時間で3回に分けて、喋酸アンモニウム(0.145 g, 0.0023 mol)を加えた。懸濁液を4.5時間還流させた。触媒を濾過して除去し(シリカゲル)、メタノール(4 × 3 ml)で洗浄した。合わせた濾液を濃縮し、残渣をメタノール:ジクロロメタン(1:9, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、ヌクレオシド74(0.015 g, 67%)を得た。スペクトルデータは先の74の実施例について報告されたものと一致した。

## 【0520】

## 実施例87

1-(2-アミノ-2-デオキシ-2-N,4-C-メチレン-2-N-トリフルオロアセチル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(74-COCF<sub>3</sub>)。

メタノール(2 mL)中のヌクレオシド74(0.050 g, 0.186 mmol)懸濁液にDMAP(0.013 mg, 0.106 mmol)およびエチルトリフルオロアセテート(0.029 mL, 0.242 mol)を加え、混合物を室温で2.5時間攪拌した。溶媒を減圧下で除去し、残渣をメタノール:ジクロロメタン(2.5:97.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、減圧下で溶媒を蒸発させた後、白色固体として表題のヌクレオシド74-COCF<sub>3</sub>を得た(0.055 g, 81%)。

## 【0521】

FAB-MS m/z 366 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 62.9 MHz) δ 166.5, 157.7 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> 37.5 Hz, COCF<sub>3</sub>), 157.6 (q, <sup>2</sup>J<sub>C,F</sub> 37.2 Hz, COCF<sub>3</sub>), 151.8, 136.8, 136.8, 117.6 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> 287.5 Hz, CF<sub>3</sub>), 117.5 (d, <sup>1</sup>J<sub>C,F</sub> 286.5 Hz, CF<sub>3</sub>), 110.8, 110.8, 90.7, 89.3, 87.7, 87.3, 70.1, 68.6, 66.2, 66.2, 64.5, 57.9, 53.3, 12.7.

## 【0522】

C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>F<sub>3</sub>についての分析: C, 42.8; H, 3.9; N, 11.5. 実測値: C, 42.5; H, 4.0; N, 11.2.

## 【0523】

## 実施例88

1-(2-アミノ-2-デオキシ-5-O-4,4'-ジメトキシトリチル-2-N,4-C-メチレン-2-N-トリフルオロアセチル- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(74-DMT)。

無水ピリジン(0.6 mL)中のヌクレオシド74-COCF<sub>3</sub>(0.030 g, 0.082 mmol)溶液に無水ピリジン:ジクロロメタン(0.6 mL, 1:1, v/v)に溶解した4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(0.054 g, 0.159 mmol)を0°Cで滴加し(20分)、混合物を室温で10時間攪拌した。水と水の混合物を加え(5 mL)、得られた混合物をジクロロメタン(3 × 5 mL)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 2 mL)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過した。濾液を減圧下で蒸発乾固させ、残渣をメタノール:ジクロロメタン:ピリジン(1.5:98.0:0.5, v/v/v)を溶出

液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、減圧下で溶媒を蒸発した後、白色固体としてヌクレオシド74-DMTを得た(0.051 g, 93%)。

### 【0524】

FAB-MS  $m/z$  667 [M]<sup>+</sup>, 668 [M+H]<sup>+</sup>.  $C_{34}H_{52}N_3O_8F_3^+$ についてのFAB-HRMS: 667.21  
42. 実測値: 667.2146.

### 【0525】

<sup>13</sup>C NMR ( $C_5D_5N$ , 100.6 MHz)  $\delta$  165.1, 165.0, 159.5, 159.5, 151.4, 145.7, 136.3, 136.1, 134.8, 134.6, 130.9, 130.9, 130.9, 128.9, 128.9, 128.7, 128.4, 127.7, 123.2, 114.1, 114.1, 114.0, 110.4, 89.4, 87.9, 87.5, 87.4, 87.2. 70.8, 69.0, 66.0, 64.4, 60.5, 60.2, 55.5, 53.6, 53.4, 49.9, 13.2, 13.1.

### 【0526】

#### 実施例89

1-(2-アミノ-3-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ-2-デオキシ)-5-O-4,4'-ジメトキシトリチル-2-N,4-C-メチレン-2-N-トリフルオロアセチル- $\beta$ -D-リボフラノシル)チミン(74A)。

無水ジクロロメタン(2 mL)中のヌクレオシド74-DMT(0.121 g, 0.181 mmol)の溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.093 mL, 0.54 mmol)および2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.057 mL, 0.26 mmol)を0℃で加え、混合物を室温で10時間攪拌した。混合物をジクロロメタン(20 mL)で希釈し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 10 mL)で抽出し、乾燥し( $Na_2SO_4$ )、濾過した。濾液を減圧下で蒸発乾固させ、残渣をメタノール:ジクロロメタン:ピリジン(1.5:98.0:0.5, v/v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、減圧下で溶媒を蒸発した後、粗生成物(0.107 g)を得た。残渣を無水ジクロロメタン(1 mL)に溶解し、激しく攪拌しながら石油エーテル(60-80 ℃, 30 mL)に-30℃で滴加し、濾過後、白色固体としてヌクレオシド74Aを析出した(0.090 g, 57%)。

### 【0527】

FAB-MS  $m/z$  868 [M+H]<sup>+</sup>, 890 [M+Na]<sup>+</sup>.

<sup>31</sup>P NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>S, 121.5 MHz) δ 150.4, 150.2, 148.8, 149.1.

### 【0528】

#### 実施例90

1-(2-アミノ-2-N,4-C-メチレン-3,5-O-(テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-β-D-リボフラノシリル)チミン(74B)。

無水ピリジン(3 mL)中のヌクレオシド74 (0.20 g, 0.74 mmol)の溶液に1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン (0.305 mL, 0.0011 mol)を-15°Cで滴加し(3時間)、混合物を室温で10時間攪拌した。MeOH (3 mL)を加え、混合物を減圧下で蒸発乾固させた。残渣をメタノール:ジクロロメタン(1:99, v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、減圧下で溶媒を蒸発した後、白色固体としてヌクレオシド74Bを得た (0.370 mg, 97%)。

### 【0529】

FAB-MS m/z 512 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 400 MHz) δ 11.37 (bs, 1H), 7.48 (s, 1H), 5.32 (s, 1H), 4.06 (d, 1H, J 13.5 Hz), 4.00 (s, 1H), 3.84 (d, 1H, J 13.5 Hz), 3.41 (s, 1H), 2.92 (d, 1H, J 10.2 Hz), 2.64 (d, 1H, J 10.2 Hz), 1.74 (s, 3H), 1.10-0.92 (m, 28 H).

### 【0530】

<sup>13</sup>C NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>, 62.9 MHz) δ 163.8, 149.8, 134.1, 107.9, 89.5, 87.9, 70.1, 61.1, 57.9, 49.3, 17.2, 17.2, 17.0, 16.9, 16.8, 16.7, 12.6, 12.2, 11.7.

### 【0531】

C<sub>23</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>についての分析: C, 54.0; H, 8.1; N, 8.2. 実測値: C, 54.0; H, 8.3; N, 7.8.

### 【0532】

#### 実施例91

1-(2-デオキシ-2-メチルアミノ-2-N,4-C-メチレン-3,5-O-(テトライソプロピルジシロキサン-1,3-ジイル)-β-D-リボフラノシリル)チミン(74C)。

無水THF:ジクロロメタン(4:1, v/v)中のヌクレオシド74B (0.33 g, 0.64 mmol)

の溶液に1,8-ジアザビシクロ[5.4.0]ウンデカ-7-エン(DBU, 0.125 mL, 0.836 mmol)およびヨウ化メチル(0.05 mL, 0.79 mmol)を-10°Cで滴加し(30分)、混合物を10°Cで48時間攪拌した。反応混合物にDBU (0.05 mL, 0.33 mmol) およびヨウ化メチル(0.020 mL, 0.32 mmol)をさらに滴加し(15分)、10°Cで24時間攪拌した。混合物を減圧下で蒸発乾固させ、残渣をメタノール:ジクロロメタン(1:99, v/v)を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、減圧下で溶媒を蒸発した後、白色固体としてヌクレオシド74Cを得た(0.25 g, 74%)。

## 【0533】

FAB-MS  $m/z$  526 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.19 (bs, 1H), 7.65 (d, 1H, J 1.3 Hz), 5.59 (s, 1H), 4.11 (s, 1H), 4.05 (d, 1H, J 13.2 Hz), 3.87 (d, 1H, J 13.2 Hz), 3.44 (s, 1H), 2.98 (d, 1H, J 9.5 Hz), 2.71 (d, 1H, J 9.5 Hz), 2.72 (s, 3H), 1.91 (d, 1H, J 1.1 Hz), 1.12–0.96 (m, 28 H).

## 【0534】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 62.9 MHz) δ 163.7, 149.6, 135.2, 109.7, 90.9, 85.7, 71.4, 67.3, 58.6, 58.2, 41.2, 17.5, 17.4, 17.3, 17.2, 17.1, 16.9, 13.3, 13.1, 13.0, 12.6, 12.1.

## 【0535】

C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>Si<sub>2</sub>, 0.25H<sub>2</sub>Oについての分析: C, 54.4; H, 8.3; N, 7.9. 実測値: C, 54.4; H, 8.1; N, 7.7.

## 【0536】

## 実施例92

1-(2-デオキシ-2-メチルアミノ-2-N,4-C-メチレン-β-D-リボフラノシリル)チミン(74D).

THF中のヌクレオシド74C (0.40 g, 0.76 mmol)溶液にTHF中のテトラブチルアンモニウムフルオライド溶液(1.0 M, 2.2 mL, 2.2 mmol)を室温で加え、反応混合物を20分間攪拌し、ピリジン:水:メタノール(6 mL, 3:1:1, v/v/v)を加えた。混合物をピリジン:水:メタノール(6 mL, 3:1:1, v/v/v)に懸濁したDowex 50x200樹脂(2.2 g, H<sup>+</sup>(ピリジニウム)形態, 100–200 メッシュ)に加え、得られた混合物

を20分間攪拌した。濾過した後、残渣をピリジン:水:メタノール(3×3 mL, 3:1:1, v/v/v)で洗浄し、合わせた濾液を減圧下で蒸発乾固させ、メタノール(2×5 mL)と共に蒸発させた後、油状の残渣を得た。メタノール:ジクロロメタン(1:49, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィにより、減圧下で溶媒を除去した後、白色固体としてヌクレオシド74Dを得た(0.17 g, 79%)。

## 【0537】

FAB-MS m/z 284 [M+H]<sup>+</sup>. C<sup>12</sup>H<sup>18</sup>N<sup>3</sup>O<sup>5</sup>についてのFAB-HRMS: 284.12465. 実測値: 284.12402.

## 【0538】

<sup>1</sup>H NMR ((CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, 400 MHz) δ 11.3 (bs, 1H, NH), 7.70 (d, 1H, J 1.1 Hz, 6-H), 5.50 (s, 1H, 1'-H), 5.26 (d, 1H, J 4.9 Hz, 3'-OH), 5.12 (t, 1H, J 5.7 Hz, 5'-OH), 3.87 (d, 1H, J 4.8 Hz, 3'-H), 3.67 (d, 2H, J 5.5 Hz, 5'-H), 3.12 (s, 1H, 2'-H), 2.87 (d, 1H, J 9.3 Hz, 5''-H<sub>a</sub>), 2.56 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.52–2.49 (1H, m, 5''-H<sub>b</sub>), 1.77 (s, 3H, CH<sub>3</sub>).

## 【0539】

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) δ 7.80 (d, 1H, J 1.3 Hz, 6-H), 5.71 (s, 1H, 1'-H), 4.07 (s, 1H, 3'-H), 3.83 (s, 2H, 5'-H), 3.36 (s, 1H, 2'-H), 3.08 (d, 1H, J 9.9 Hz, 5''-H<sub>a</sub>), 2.68 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.57 (d, 1H, J 9.9 Hz, 5''-H<sub>b</sub>), 1.88 (d, 3H, J 1.1 Hz, CH<sub>3</sub>).

## 【0540】

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 62.9 MHz) δ 166.6, 151.9, 137.4, 110.4, 91.3, 85.2, 71.4, 69.1, 59.4, 58.7, 40.2, 12.2.

## 【0541】

## 実施例93

1-(2-デオキシ-5-O-4,4'-ジメトキシトリチル-2-メチルアミノ-2-N,4-C-メチレン-β-D-リボフラノシリル)チミン(74E)。

無水ピリジン(1.5 mL)中のヌクレオシド74D (0.135 g, 0.477 mmol)の溶液に無水ピリジン:ジクロロメタン(1.0 mL, 1:1, v/v)中の4,4'-ジメトキシトリチル

クロライド(0.238 g, 0.702 mmol)溶液を0°Cで滴加し(20分)、得られた混合物を室温で10時間攪拌した。水と水の混合物(5 mL)を加え、混合物をジクロロメタン(3 × 10 mL)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 5 mL)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過した。濾液を蒸発乾固させ、残渣をメタノール:ジクロロメタン:ピリジン(1:98:1, v/v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、減圧下で溶媒を除去した後、白色固体としてヌクレオシド74Eを得た(0.20 g, 72%)。

## 【0542】

FAB-MS m/z 586 [M+H]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>N, 400 MHz) δ 13.2 (bs, 1H), 7.98 (d, 1H, J 1.3 Hz), 7.98–7.00 (m, 13H), 6.12 (s, 1H), 4.78 (d, 1H, J 3.7 Hz), 3.88–3.79 (m, 4H), 3.71 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.29 (d, 1H, J 9.3 Hz), 2.84 (d, 1H, J 9.3 Hz), 2.81 (s, 3H), 1.85 (d, 3H, J 0.9 Hz).

## 【0543】

<sup>13</sup>C NMR (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>N, 62.9 MHz) δ 165.1, 159.2, 151.4, 145.9, 136.5, 136.4, 130.8, 130.7, 128.7, 128.4, 127.4, 113.8, 109.6, 89.8, 86.8, 85.1, 72.0, 68.7, 60.9, 59.4, 55.2, 40.1, 13.1.

C<sub>13</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, 0.25H<sub>2</sub>Oについての分析: C, 67.2; H, 6.1; N, 7.1. 実測値: C, 67.2; H, 6.2; N, 6.9.

## 【0544】

## 実施例94

1-(3-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)-5-O-4,4'-ジメトキシトリチル-2-メチルアミノ-2-N,4-C-メチレン-2-デオキシ-β-D-リボフラノシル)チミン(74F)。

無水ジクロロメタン(2 mL)中のヌクレオシド74E(0.130 g, 0.222 mmol)の溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.088 mL, 0.514 mmol)および2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(0.065 mL, 0.291 mmol)を0°Cで加え、混合物を室温で10時間攪拌した。ジクロロメタン(30 mL)を加え、混合物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 10 mL)で抽出し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、

濾過した。濾液を減圧下で蒸発乾固させ、残渣をメタノール：ジクロロメタン：ピリジン(0.5:98.5:1.0, v/v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、減圧下で溶媒を除去した後、粗生成物を得た(0.120 g)。残渣を無水ジクロロメタン(1 mL)に溶解し、激しく攪拌しながら石油エーテル(60-80°C, 30 mL)に-30°Cで滴加し、濾過後、白色固体としてヌクレオチド<sup>74</sup>Fを析出した(0.090 g, 52%)。

## 【0545】

<sup>31</sup>P NMR (CD<sub>3</sub>CN, 121.5 MHz) δ 147.7.

## 【0546】

## 実施例95

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)-2-O-p-トルエンスルホニル-β-D-リボフラノシル)ウラシル(75)。

ジクロロメタン(50 cm<sup>3</sup>)中の1-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル-β-D-リボフラノシル)ウラシル41(3.55 g, 7.81 mmol)の攪拌溶液に DMAP(3.82 g)および塩化p-トルエンスルホニル(4.47 g, 23.5 mmol)を室温で加えた。2時間攪拌し、ジクロロメタン(100 cm<sup>3</sup>)を加えた。反応混合物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 75 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。有機相を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(99.5:0.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド75を得た(4.65g, 78%)。

## 【0547】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 8.49 (1H, br s, NH), 7.67 (1H, d, J 8.3, 6-H), 7.51-7.03 (18H, m, Bn, Ts), 6.0 (1H, d, J 7.6, 1'-H), 5.05 (1H, m, 2'-H), 4.91 (2H, m, 5-H, Bn), 4.56 (2H, m, Bn), 4.42 (1H, d, J 10.4, Bn), 4.31 (1H, d, J 4.9, 3'-H), 4.05 (2H, m, 1''-H), 3.75-3.64 (2H, m, 5'-H), 2.41 (3H, s, OH), 2.34 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0548】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 162.2 (C-4), 149.5 (C-2), 146.0, 145.3 (Ts), 139.0 (C-6), 136.7, 131.9, 130.0, 129.9, 128.9, 128.7, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.

0, 127.6 (Bn, Ts) 102.7 (C-5), 85.5 (1'-C), 84.4 (4'-C), 79.2, 78.3, 75.1, 74.3, 72.4, 69.1 (Bn, 3'-C, 2'-C, 5'-C, 1''-C), 21.7, 21.6 (Ts).

## 【0549】

FAB-MS  $m/z$  763. 実測値: C, 61.2; H, 4.4; N, 3.3;  $C_{18}H_{18}N_2O_1S_2$  の理論値 C, 59.8; H, 5.0; N, 3.6.

## 【0550】

## 実施例96

1-(2-デオキシ-3,5-ジ-O-ベンジル-2-S,4-C-メチレン-2-メルカプト- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(76)。

DMF ( $40\text{ cm}^3$ )中のヌクレオシド75 (3.70g, 4.86 mmol)の攪拌溶液にチオ酢酸カリウム (0.83 g, 7.28 mmol)を加えた。混合物を攪拌し、110°Cで80時間熱した。減圧下で蒸発させた後、 $H_2O$  ( $100\text{ cm}^3$ )を加えた。抽出をジクロロメタン ( $4 \times 50\text{ cm}^3$ )で行い、合わせた有機相を乾燥し( $Na_2SO_4$ )、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール (99.6:0.4, v/v) を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド76 (1.65g, 75%)を得た。

## 【0551】

$\delta_{1H}$  ( $CDCl_3$ ) 9.08 (1H, br s, NH), 7.98 (1H, d,  $J$  8.1, 6-H), 7.39-7.20 (10H, m, Bn), 5.85 (1H, s, 1'-H), 5.26 (1H, d,  $J$  8.1, 5-H), 4.61 (1H, d,  $J$  11.4, 5'-H), 4.56 (2H, s, Bn), 4.45 (1H, d,  $J$  11.4, Bn), 4.14 (1H, d,  $J$  1.7, 3'-H), 3.82 (2H, m, Bn), 3.72 (1H, d,  $J$  1.9, 2'-H), 3.02 (1H, d,  $J$  9.9, 1''-H<sub>a</sub>), 2.78 (1H, d,  $J$  9.9, 1''-H<sub>b</sub>).

## 【0552】

$\delta_c$  ( $CDCl_3$ ) 163.4 (C-4), 150.0 (C-2), 139.9 (C-6), 137.2, 136.8, 128.6, 128.5, 128.2, 127.9, 127.7 (Bn), 100.8 (C-5), 90.8, 88.8 (C-1', C-4'), 76.5, 73.8, 72.0, 70.0 (2 x Bn, C-3', C-5'), 49.52 (C-2'), 35.63 (C-1''). FAB-MS  $m/z$  453. 実測値: C, 63.4; H, 5.1; N, 5.9;  $C_{24}H_{24}N_2O_5S$  の理論値 C, 63.7; H, 5.3; N, 6.1.

## 【0553】

## 実施例97

1-(2-O-トルエンスルホニル-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)ウラシル(76A)。

無水エタノール(2 cm<sup>3</sup>)中の化合物75 (0.80 g, 1.0 mmol)の溶液に炭素上の20%水酸化パラジウム(0.80 g)を加え、混合物を水素で数回脱ガスし、水素下で48時間攪拌した。触媒を濾過して除去し、濾液を減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(99:1, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド76Aを得た(0.30 g, 4%)。

## 【0554】

$\delta_{\text{H}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 7.67 (4H, m), 7.45 (1H, d, J 8.2 Hz), 7.34 (4H, m), 5.86 (1H, d, J 8.0 Hz), 5.40 (1H, d, J 8.1 Hz), 4.95 (1H, m), 4.35 (1H, d, J 5.0 Hz), 4.17 (2H, m), 3.61 (2H, s), 2.40 (6H, s).

## 【0555】

$\delta_{\text{C}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 165.4, 151.6, 147.5, 146.6, 141.3, 134.0, 133.8, 131.4, 130.9, 129.2, 128.9, 103.7, 88.0, 85.4, 80.7, 72.4, 71.0, 64.3, 21.7, 21.6. FAB-MS m/z 583 [M+H]<sup>+</sup>.

## 【0556】

## 実施例98

1-(3,5-O-(テトライソプロピルジシロキサ-1,3-ジイル)-2-O-p-トルエンスルホニル-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)ウラシル(76B)。

無水ピリジン(4 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド76A (0.27 g, 0.46 mmol)の攪拌溶液に1,3-ジクロロ-1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキサン(0.22 cm<sup>3</sup>, 0.70 mmol)を加えた。48時間攪拌した後、混合物を0°Cに冷却し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(15 cm<sup>3</sup>)を加えた。混合物をジクロロメタン(3 × 10 cm<sup>3</sup>)で抽出し、合わせた有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過した。溶媒を減圧下で蒸発させ、残渣をジクロロメタン/メタノール(99.5:0.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド76Bを得た(0.37

g, 97%)。

【0557】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.70 (1H, br s), 7.80 (4H, m), 7.36 (4H, m), 6.98 (1H, d,  $J$  8.1 Hz), 5.64 (1H, d,  $J$  8.0 Hz), 5.18 (2H, m), 4.98 (1H, d,  $J$  7.0 Hz), 4.39–4.32 (2H, m), 3.92–3.76 (2H, s), 2.45 (6H, s), 1.27–0.66 (28H, m).

【0558】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 162.9, 149.3, 145.6, 144.8, 143.9, 132.9, 130.1, 129.9, 128.2, 128.1, 102.2, 94.6, 84.7, 80.4, 72.8, 67.8, 64.6, 21.7, 17.3, 17.2, 17.1, 16.9, 16.8, 13.1, 12.8, 12.3.

FAB-MS  $m/z$  825 [ $M+\text{H}]^+$ .

【0559】

実施例99

1-(2-デオキシ-2-メルカブト-2-S,4-C-メチレン-3,5-O-(テトライソプロピルジシロキサ-1,3-ジイル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)ウラシル(76C)。

DMF (5 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド76B (0.26 g, 0.32 mmol)の攪拌溶液に チオ酢酸カリウム (0.054 g, 0.47 mmol)を加えた。反応混合物を110°Cで20時間攪拌した。減圧下で混合物を蒸発させた後、H<sub>2</sub>O (20 cm<sup>3</sup>)を加えた。抽出をジクロロメタン (3 × 10 cm<sup>3</sup>)で行い、合わせた有機相を乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(99.25:0.75, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固形物としてヌクレオシド 76C を得た(0.125 g, 77%)。

【0560】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 8.55 (1H, br s), 8.02 (1H, d,  $J$  8.1 Hz), 5.82 (1H, s, 1'-H), 5.65 (1H, d,  $J$  8.1 Hz), 4.37 (1H, d,  $J$  2.1 Hz), 4.10 (1H, d,  $J$  13.2 Hz), 3.90 (1H, d,  $J$  13.1 Hz), 3.53 (1H, d,  $J$  2.1 Hz), 2.92 (1H, d,  $J$  10.1 Hz), 2.74 (1H, d,  $J$  10.0 Hz), 1.30–0.80 (28H, m).

【0561】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 163.2, 149.8, 139.6, 100.9, 91.4, 90.7, 71.5, 59.8, 51.5, 34.4, 17.5, 17.3, 17.1, 16.9, 15.5, 13.6, 13.3, 13.1, 12.9, 12.3.

FAB-MS  $m/z$  515 [M+H]<sup>+</sup>.

### 【0562】

実施例100

1-(2-デオキシ-2-メルカプト-2-S,4-C-メチレン- $\beta$ -D-リボフラノシリ)ウラシル(76D)。

THF(1.0 cm<sup>3</sup>)中のヌクレオシド76C(25 mg, 0.049 mmol)の攪拌溶液にフッ化テトラブチルアンモニウム溶液(THF中の1M溶液0.20 cm<sup>3</sup>, 0.20 mmol)を0°Cで加えた。混合物を0°Cで1時間攪拌した後、H<sub>2</sub>O(5 cm<sup>3</sup>)を加え、混合物を蒸発させた。残渣をジクロロメタン/メタノール(97:3, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド 76Dを得た(9.0 mg, 69%)。

### 【0563】

$\delta_{\text{H}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 8.19 (1H, d,  $J$  8.1 Hz, 6-H), 5.77 (1H, s, 1'-H), 5.65 (1H, d,  $J$  8.1 Hz, 5-H), 4.31 (1H, d,  $J$  2.1 Hz, 3'-H), 3.86 (2H, s, 5'-H), 3.53 (1H, d,  $J$  2.2 Hz, 2'-H), 2.93 (1H, d,  $J$  10.3 Hz, 1''-H<sub>a</sub>), 2.73 (1H, d,  $J$  10.3 Hz, 1''-H<sub>b</sub>).

### 【0564】

$\delta_{\text{C}}$  (CD<sub>3</sub>OD) 166.5, 152.0, 141.7, 101.2, 92.1, 92.0, 71.4, 59.9, 53.6, 35.4.

FAB-MS  $m/z$  273 [M+H]<sup>+</sup>.

### 【0565】

実施例101

1-(2-デオキシ-5-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-メルカプト-2-S,4-C-メチレン- $\beta$ -D-リボフラノシリ)ウラシル(76E)。

無水ピリジン(5 cm<sup>3</sup>)中の76D(0.2 g, 0.37 mmol)の溶液に4,4'-ジメトキシトリチルクロライド(0.186 g, 0.55 mmol)を室温で加えた。溶液を5時間攪拌し、反応混合物を0°Cに冷却した。炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(30 cm<sup>3</sup>)を加え、得られた混合物をジクロロメタン(3 × 50 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を分離し、乾燥した(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン/メタ

メタノール/ピリジン(98.5:1.0:0.5 v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白茶色の固体物としてヌクレオシド76Eを得た(0.175 g, 83%)。

### 【0566】

$\delta_c$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 164.5, 159.4, 151.6, 145.7, 139.9, 136.4, 136.0, 135.6, 130.9, 130.8, 128.8, 128.5, 128.4, 127.5, 127.4, 122.7, 113.9, 101.5, 91.7, 90.2, 87.6, 71.8, 61.9, 55.3, 53.7, 36.2, 30.6.

### 【0567】

FAB-MS  $m/z$  574 [M]<sup>+</sup>, 575 [M+H]<sup>+</sup>

(実測値: C, 65.2; H, 5.4; N, 5.0;  $C_{31}H_{30}N_2O_7S$  の理論値C, 64.8; H, 5.3; N, 4.9%).

### 【0568】

#### 実施例102

1-(3-O-(2-シアノエトキシ(ジイソプロピルアミノ)ホスフィノ)-(2-デオキシ-5-O-(4,4'-ジメトキシトリチル)-2-メルカプト-2-S,4-C-メチレン- $\beta$ -D-リボフラノシル)ウラシル(76F)。

無水ジクロロメタン( $2 \text{ cm}^3$ )中の76E(0.160 g, 0.28 mmol)の溶液にN,N-ジイソプロピルエチルアミン( $0.27 \text{ cm}^3$ )および2-シアノエチルN,N-ジイソプロピルホスホラミドクロリダイト(97mg, 0.42 mmol)を0°Cで加えた。室温で5時間攪拌した。反応混合物を0°Cに冷却し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液( $30 \text{ cm}^3$ )を加えた。抽出はジクロロメタン( $3 \times 20 \text{ cm}^3$ )を用いて行い、合わせた有機相を乾燥し( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )減圧下で蒸発乾固させた。残渣をジクロロメタン/メタノール/ピリジン(99:0.5:0.5 v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色発泡体を得た。この残渣をジクロロメタン( $2 \text{ cm}^3$ )に溶解し、生成物を激しく攪拌しながら揮発油( $100 \text{ cm}^3$ , -40°Cに冷却)から析出した。析出物を濾過して回収し、最後に乾燥し、白色固体物としてヌクレオシド76Fを得た(95 mg, 44%)。

### 【0569】

$\delta_p$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 148.9, 149.0.

## 【0570】

## 実施例103

3,5-ジ-0-ベンジル-1,2-0-イソプロピリデン-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノース(77)。

3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル-1,2-0-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラノース31(15.38 g, 38.4 mmol)、無水ピリジン(20 cm<sup>3</sup>)および無水ジクロロメタン(80 mL)の溶液を-5°Cで攪拌した。無水ジクロロメタン(8 cm<sup>3</sup>)に溶解した塩化p-トルエンスルホニル(8.75 g, 46.0 mmol)を15分で加えた。溶液を室温で17時間攪拌した。反応を氷冷水(200 cm<sup>3</sup>)で失活させた、抽出をジクロロメタン(5 × 150 cm<sup>3</sup>)で行い、合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 100 cm<sup>3</sup>)およびブライン(3 × 100 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン：メタノール(98.5:1.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として77を得た(17.4 g, 82%)。

## 【0571】

$\delta_{\text{H}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 7.79–7.19 (14H, m, Bn), 5.66 (1H, d, J 3.6, 1-H), 4.69–4.20 (8H, m, Bn, 5-H<sub>a</sub>, 5-H<sub>b</sub>, 3-H, 2-H), 3.53 (1H, d, J 10.3, 1'-H<sub>a</sub>), 3.46 (1H, d, J 10.3, 1'-H<sub>b</sub>), 2.40 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.29 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 1.26 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0572】

$\delta_{\text{C}}$  (CDCl<sub>3</sub>) 144.6, 137.9, 137.3, 133.0, 129.8, 128.4, 128.3, 128.1, 128.0, 127.9, 127.7, 127.6 (芳香族), 113.6 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 104.2, (C-1), 84.7 (C-4), 79.0, 78.7, 73.7, 72.7, 70.7, 70.2, (Bn, C-2, C-3, C-5, C-1'), 26.3, 26.0 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 21.6 (CH<sub>3</sub>).

FAB-MS m/z 555 [M+H]<sup>+</sup>.

(実測値: C, 64.8; H, 6.2; C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>8</sub>S の理論値 C, 64.9; H, 6.1%).

## 【0573】

## 実施例104

1,2-ジ-0-アセチル-3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチ

ル)- $\alpha$ , $\beta$ -D-リボフラノース(78)。

80% 酢酸(250 cm<sup>3</sup>)中のフラノース77(17.4 g, 31.4 mmol)の溶液を60℃で20時間攪拌した。溶媒を真空中で除去し、残渣をトルエン(3 × 20 cm<sup>3</sup>)と共に蒸発させた。残渣を無水ピリジン(100 cm<sup>3</sup>)に再び溶解した。無水酢酸(14.2 cm<sup>3</sup>)を加え、溶液を室温で15時間攪拌した。反応を氷冷水(200 cm<sup>3</sup>)を加えて失活させ、混合物をジクロロメタン(4 × 150 cm<sup>3</sup>)で抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(2 × 125 cm<sup>3</sup>)およびブライン(3 × 150 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン:メタノール(98.5:1.5, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として78を得た( $\alpha$ , $\beta$  ~1:1)(13.5 g, 72%)。

#### 【0574】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 169.8, 169.6, 69.4, 168.8 (C=O), 144.7, 137.7, 137.5, 132.8, 129.7, 129.6, 128.5, 128.4, 128.3, 128.2, 128.0, 127.8, 127.7, 127.6 (Bn), 97.4, 94.2 (C-1), 86.4, 84.2 (C-4), 78.9, 77.5, 74.5, 74.1, 73.7, 73.5, 71.8, 70.6, 70.5, 69.6, 69.5 (Bn, C-2, C-3, C-1'), 21.6, 21.0, 20.8, 20.6, 20.4 (COCH<sub>3</sub>, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

FAB-MS m/z 599 [M+H]<sup>+</sup>.

#### 【0575】

化合物78の別の生成方法

3-O-ベンジル-1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-グルコフラノース(30B)。

ジメチルホルムアミド中の0℃の1,2:5,6-ジ-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-アロフラノース(30A)(Pfanstiehl Laboratories Inc.より入手)(40 g)の溶液に水素化ナトリウムを少量ずつ加えた。反応混合物を1時間攪拌し、臭化ベンジルを1時間かけて滴加した。反応混合物を室温で16時間攪拌した。メタノールを加えて反応を失活させ、ジメチルホルムアミドを減圧下で除去した。酢酸エチルでシロップを抽出し、ブラインで洗浄した。酢酸エチル層を蒸発し、半固体を得た(93%)。TLCにより同質。

#### 【0576】

3-O-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-グルコフラノース(30C)。

30B (50 g)を75%酢酸中で20時間部分加水分解した。少量に濃縮し、酢酸エチルで抽出し、40 g (90%)の30Cを得た。TLCにより同質。

### 【0577】

3-O-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボペントジアルドフラノース(30D)。

水/メタノール(1:1)中の30C (40 g)溶液を攪拌しながら水中の過酸化ナトリウム溶液に0°Cで加えた。反応を2時間攪拌し、エチレングリコールを加え、混合物を酢酸エチルで抽出した。乾燥抽出物を蒸発させ、30D, 32 g, (89%)を得た。TLCにより同質。この工程において、メタノールの添加は反応を完了するために不可欠である。

### 【0578】

3-O-ベンジル-4-(ヒドロキシメチル)-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-エリスロペントフラノース(30E)。

37%水性ホルムアルデヒドおよび1N水酸化ナトリウムを水およびテトラヒドロフラン(1:1)中の30D (32 g)の攪拌溶液に0°Cで加え、反応を16時間継続し、酢酸エチルで抽出し、塩水で洗浄した。有機層を蒸発させてエーテル/石油エーテルから白色固体として結晶した23 gのシロップを得た。濾液は低融点固体として固化した10 gの油であった。あわせて30E, 92%を得た。[23 g (白色固体はTLCより純度99%), 低融点固体10 g (had faster moving impurities by TLC, 純度約75%)]。この工程において、テトラヒドロフランの添加は時間および反応を完了するために不可欠である。

### 【0579】

3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-ヒドロキシメチル-1,2-O-イソプロピリデン- $\alpha$ -D-リボフラノース(31)。

NaH 60%とBnBrを用いて30E (20 g)を-10°Cでベンジル化し、2つのアイソマーを得た。フラッシュカラムクロマトグラフィにより、主アイソマーとして31、14 g, (54%)を得た。TLCにより同質。

### 【0580】

3,5-ジ-O-ベンジル-1,2-O-イソプロピリデン-4-C-トシリル- $\alpha$ -D-リボフラノース(

77)。

ピリジン中の31 (12.5 g)の溶液を塩化p-トルエンスルホニルで0℃で処理し、反応を室温で14~16時間継続した。ピリジンを除去し、塩化メチレンで抽出し、重炭酸塩溶液で飽和し、77, 14 g, (80%)を得た。TLCにより同質。

### 【0581】

1,2-ジ-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-トシリ-D-リボフラノース(78)。

77 (14 g)の加水分解を75% 酢酸中65℃で18時間行った。溶媒を減圧下で除去し、残渣をエタノール (3x100)、トルエン(3x50)および無水ピリジン (2x50)で処理した。(この化合物78 は石油エーテルから細かい白色固体として結晶化した。)残渣を乾燥ピリジンに入れ、室温で8時間無水酢酸で処理した。酢酸エチルで抽出し、重炭酸塩で飽和し、次いでブラインで洗浄し、 $\alpha$  および  $\beta$  アノマーの混合物として12g, (83%)の78を得た。78 の信用あるサンプルと直接比較(TLC, HPLC, NMR)することにより、その同定と純度を確認した。

### 【0582】

#### 実施例 105

1-(2-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン (79)。

無水アセトニトリル (182 cm<sup>3</sup>)中のアノマー混合物78 (12.8 g, 21.4 mmol)およびチミン (5.38 g, 42.7 mmol)の攪拌溶液にN,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(31.68 mL, 128.23 mmol)を加えた。反応混合物を室温で1時間攪拌し、攪拌を60℃で1.5時間継続した。0℃に冷却した後、トリメチルシリルトリフレート(6.57 mL, 30.33 mmol)を滴加し、混合物を60℃で10時間攪拌した。反応混合物を氷冷した炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(90 mL)で中和した。反応混合物を濾過し、濾液を減圧下で容量が半分になるまで濃縮した。ジクロロメタン (4 × 200 cm<sup>3</sup>)を用いて抽出した。合わせた有機相を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(3 × 150 cm<sup>3</sup>)およびブライン(3 × 150 mL)で洗浄し、乾燥し(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン:メタノール (99:1~98:2, v/v)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド 79を得た(13.1 g, 92%)。

## 【0583】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.04 (s, 1H, NH), 7.73–7.19 (15H, m, 6–H, 芳香族), 5.94 (1H, d,  $J$  5.5, 1’–H), 5.37 (1H, d,  $J$  5.6, 2’–H), 4.57–4.40 (5H, m, 3’–H, 5’–H<sub>a</sub>, 5’–H<sub>b</sub>, Bn), 4.14 (2H, s, Bn), 3.75 (1H, d,  $J$  10.2, 1’’–H<sub>a</sub>), 3.57 (1H, d,  $J$  10.2, 1’’–H<sub>b</sub>), 2.41 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_5$ ), 2.02 (3H, s,  $\text{COCH}_3$ ), 1.54 (3H, s,  $\text{CH}_3$ ).

## 【0584】

$\delta_{\text{C}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 169.8 (C=O), 163.5 (C-4), 150.2 (C-2), 145.0, 136.8, 135.6, 132.1, 129.7, 128.5, 128.0, 127.9, 127.8, 127.5 (芳香族), 113.5 (C-5), 86.8, 85.3, 77.6, 74.6, 74.3, 73.6, 70.8, 68.8 (Bn, C-1’, C-3’, C-2’, C-4’), 21.3 ( $\text{CH}_3$ ), 20.5 ( $\text{COCH}_3$ ), 11.8 ( $\text{CH}_3$ ).

FAB-MS  $m/z$  665 [M+H]<sup>+</sup>

(実測値 C, 61.2; H, 5.3; N, 4.1; S, 4.7,  $\text{C}_{34}\text{H}_{36}\text{O}_{10}\text{N}_2\text{S}$  の理論値 C, 61.4; H, 5.4; N, 4.2; S, 4.8).

## 【0585】

## 実施例 106

1-(3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-(p-トルエンスルホニルオキシメチル)- $\beta$ -D-リボフラノシリル)チミン(80)。

ヌクレオシド79 (13.1 g, 19.7 mmol)をメタノール (200 cm<sup>3</sup>, 鮎和メタノール性アンモニアを同容量のメタノールで希釈することにより調製)中のアンモニア溶液に溶解し、室温で4時間攪拌した。次いで反応混合物を蒸発させ、残渣をジクロロメタン (400 cm<sup>3</sup>)に溶解した。有機相をブライン (3 × 150 cm<sup>3</sup>)で洗浄し、乾燥し( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン:メタノール(99.5:0.5, v/v) 溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、白色固体としてヌクレオシド 80 を得た(10.7 g, 87%)。

## 【0586】

$\delta_{\text{H}}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) 9.66 (s, 1H, NH), 7.71–7.21 (15H, m, 6–H, 芳香族), 5.72 (1H, d,  $J$  5.1, 1’–H), 4.75, 4.55 (2H, それぞれ d,  $J$  11.5, Bn), 4.51 (2H, s, Bn), 4.37 (1H, t,  $J$  5.4, 2\*–H), 4.30–4.12 (3H, m, 3’–H, Bn), 3.76 (1H, d

,  $\delta$  10.2, 1''-H<sub>a</sub>), 3.59 (1H, d,  $\delta$  10.2, 1''-H<sub>b</sub>), 2.39 (3H, s, CH<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 1.48 (3H, s, CH<sub>3</sub>).

## 【0587】

$\delta_c$  (CDCl<sub>3</sub>) 163.8 (C-4), 150.9 (C-2), 145.0, 137.0, 136.9, 135.9, 132.3, 129.8, 128.7, 128.6, 128.2, 128.1, 128.0, 127.6 (芳香族), 111.0 (C-5), 89.6, 85.3, 78.4, 74.5, 73.8, 71.1, 69.7, (Bn, C-1', C-3', C-2', C-4', C-1''), 21.6 (CH<sub>3</sub>), 12.0 (CH<sub>3</sub>).

## 【0588】

FAB-MS m/z 623 [M+H]<sup>+</sup>

(実測値 C, 61.5; H, 5.2; N, 4.4; S, 5.2, C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>S の理論値 C, 61.7; H, 5.4; N, 4.5; S, 5.1).

## 【0589】

実施例 107

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンゾイルオキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン (36)。

無水 DMF (150 cm<sup>3</sup>) 中のヌクレオシド 80 (10.65 g, 17.1 mmol) の攪拌溶液に  
亜油中 (0.9 g, 22.2 mmol) の水素化ナトリウム 60%懸濁液を 0°C で少量ずつ加えた。  
混合物を 0°C で 15 時間攪拌し、60% 水素化ナトリウム (0.205 g, 5.12 mmol) を  
さらに加え、反応混合物を 0°C で 22 時間攪拌した。メタノール (20 cm<sup>3</sup>) を加え、  
次いで反応混合物を減圧下で容量が半分になるまで濃縮した。氷冷水 (300 cm<sup>3</sup>)  
を加え、抽出をジクロロメタン (5 × 150 cm<sup>3</sup>) を用いて行った。合わせた有機相  
を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液 (3 × 40 cm<sup>3</sup>) およびブライン (3 × 40 cm<sup>3</sup>) で洗  
浄し、乾燥し (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、濾過し、減圧下で蒸発させた。残渣をジクロロメタン：  
メタノール (99.5:0.5, v/v) 溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラ  
フィで精製し、白色固体としてヌクレオシド 36 を得た (7.1 g, 92%)。スペ  
クトルデータは 36 について先に得られたデータ (実測値 C, 66.2; H, 5.8; N, 6.  
1; C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> の理論値 C, 66.6; H, 5.8; N, 6.2) と一致した。

## 【0590】

実施例 108

3,5-ジ-0-ベンジル-1,2-0-イソプロピリデン-4-C-メタンスルホニルオキシメチル- $\alpha$ -D-リボフラノース(200)。

無水ピリジン(3 mL)中のフラノース31(2.16 g, 5.39 mmol)の攪拌溶液に塩化メタンスルホニル(0.61 mL, 16.0 mmol)を0°Cで滴加した。反応混合物を室温で20時間攪拌し、氷冷水(300 mL)で失活させ、ジクロロメタン(2×300 mL)で抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(300 mL)で洗浄し、乾燥した(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で蒸留して除去し、残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として生成物200を得た(2.55 g, 99%)；

#### 【0591】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.37–7.24 (10 H, m, Bn), 5.78 (1 H, d, J 3.8 Hz, H-1), 4.85 (1 H, d, J 11.7 Hz, Bn), 4.73 (1 H, d, J 11.9 Hz, Bn), 4.64 (1 H, dd, J 4.0, 5.3 Hz, H-2), 4.54 (1 H, d, J 11.9 Hz, H-5'), 4.52 (1 H, d, J 11.9 Hz, Bn), 4.46 (1 H, d, J 11.9 Hz, H-5'), 4.41 (1 H, d, J 11.8 Hz, Bn), 3.60 (1 H, d, J 10.4 Hz, H-5), 3.50 (1 H, d, J 10.5 Hz, H-5), 3.06 (3 H, s, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.68 (3 H, s, CH<sub>3</sub>), 1.34 (3 H, s, CH<sub>3</sub>);

#### 【0592】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 137.79, 137.31, 128.54, 128.48, 128.16, 128.01, 127.87, 127.79 (Bn), 113.66 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 104.46 (C-1), 84.88 (C-4), 78.48, 78.41 (C-2, C-3), 73.65, 72.63, 70.78, 70.16 (Bn, C-5, C-5'), 37.84 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 26.20 (CH<sub>3</sub>), 25.69 (CH<sub>3</sub>);

#### 【0593】

MS FAB: 501 (M+Na, 100%).

実測値: C, 60.37; H, 6.29; S, 6.53; C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>S の理論値 C, 60.24; H, 6.32; S, 6.70 %.

#### 【0594】

実施例 109

メチル3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル- $\alpha$ -D-リボフラノシド(201)。

メタノール性塩酸(20% w/w, 31.7 mL)および水(4.4 mL)中のフラノース200(1.133 g, 2.37 mmol)の溶液を室温で2時間攪拌した。炭酸水素ナトリウムで中和した後、溶液をジクロロメタン(2×150 mL)で抽出した。合わせた抽出物を水(150 mL)で洗浄し、次いで乾燥した(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で蒸留して除去し、残渣をジクロロメタン:メタノール(99:1)溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油(1.018 g, 95%)として生成物201を得た(β:α ~2:1);

## 【0595】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.39–7.22 (m, Bn), 4.86 (br s, Bn), 4.69–3.99 (m, Bn, H-5', H-1, H-2, H-3), 3.68 (d, J 8.9 Hz, H-5  $\beta$ ), 3.51 (d, J 9.8 Hz, H-5  $\alpha$ ), 3.46 (s, OCH<sub>3</sub>  $\alpha$ ), 3.34 (d, J 9.1 Hz, H-5  $\beta$ ), 3.32 (d, J 9.7 Hz, H-5  $\alpha$ ), 3.28 (s, OCH<sub>3</sub>  $\beta$ ), 2.97 (3 H, s, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  $\beta$ ), 2.93 (3 H, s, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  $\alpha$ );

## 【0596】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 137.74, 136.98, 128.70, 128.64, 128.58, 128.56, 128.37, 128.21, 128.15, 128.09, 127.98, 127.86, 127.83 (Bn), 107.54 (C-1  $\beta$ ), 103.39 (C-1  $\alpha$ ), 84.65, 83.18, 81.90, 78.87 (C-4, C-3), 75.04, 74.07, 73.73, 73.70, 73.38, 72.56, 72.11, 70.85, 70.55, 70.20 (C-2, Bn, C-5, C-5'), 55.90 (OCH<sub>3</sub>  $\alpha$ ), 54.96 (OCH<sub>3</sub>  $\beta$ ), 37.18 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  $\beta$ ), 37.07 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>  $\alpha$ );

## 【0597】

MS FAB: 475 (M+Na, 25%).

実測値: C, 58.40; H, 6.33; C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>S の理論値 C, 58.39; H, 6.24 %.

## 【0598】

## 実施例 110

(3R)- および(3S)-(1S,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-メトキシ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(202および203)。

無水 DMF(25 mL)中の 201(3.32 g, 7.34 mmol)の溶液を0°Cで攪拌し、水素化ナトリウムの60%油懸濁液(700 mg, 16.9 mmol)を加えた。混合物を室温で90分間

攪拌し、水(300 mL)で失活させ、ジエチルエーテル(2×300 mL)で抽出した。合わせた抽出物を水(200 mL)で洗浄し、乾燥した(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として2つの生成物202および203を得た(それぞれ1.571 g, 6% および0.777 g, 30%)。

### 【0599】

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-メトキシ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン (202)。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.36–7.26 (10 H, m, Bn), 4.81 (1 H, s, H-1), 4.65 (1 H, d, J 11.9 Hz, Bn), 4.61 (2 H, s, Bn), 4.56 (1 H, d, J 11.9 Hz, Bn), 4.11 (1 H, s, H-2), 4.09 (1 H, s, H-3), 4.01 (1 H, d, J 7.5 Hz, H-5'), 3.80–3.77 (3 H, m, H-5', H-5), 3.39 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>);

### 【0600】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 138.05, 137.36, 128.47, 128.44, 127.88, 127.73, 127.63 (Bn), 104.97 (C-1), 85.13 (C-4), 79.16 (C-3), 77.18 (C-2), 73.64 (Bn), 72.26, 72.10 (Bn, C-5'), 66.50 (C-5), 55.34 (OCH<sub>3</sub>);

MS FAB: 379 (M+Na, 28%).

実測値: C, 70.55; H, 6.97; C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> の理論値C, 70.77; H, 6.79 %.

### 【0601】

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-メトキシ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン (203)。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.36–7.26 (10 H, m, Bn), 5.00 (1 H, s, H-1), 4.67–4.54 (4 H, m, Bn), 4.18 (1 H, s, H-2), 3.99 (1 H, s, H-3), 3.99–3.90 (2 H, m, H-5'), 3.75–3.68 (2 H, m, H-5), 3.49 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>);

### 【0602】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 137.83, 137.53, 128.51, 128.48, 127.96, 127.82, 127.71, 127.62 (Bn), 104.05 (C-1), 88.44 (C-4), 79.54 (C-3), 77.16 (C-2), 73.68 (Bn), 72.61 (C-5'), 72.24 (Bn), 65.73 (C-5), 56.20 (OCH<sub>3</sub>);

MS FAB: 379 (M+Na, 100%).

## 【0603】

実施例 111

(1R,2S,3S)-2-ベンジルオキシ-3-ベンジルオキシメチル-1-(メトキシ(チミン-1-イル)メチル)-3-トリメチルシリルオキシテトラヒドロフラン(204)。

無水アセトニトリル(9.3 mL)中の 202(216 mg, 0.606 mmol)およびチミン(153 mg, 1.22 mmol)の溶液にBSA(N,N-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド, 0.90 mL, 3.6 mmol)を加え、還流下に15分間攪拌した。溶液を0°Cに冷却し、トリメチルシリルトリフレート(0.153 mL, 0.777 mmol)を滴加した。室温で18時間、60°Cで24時間攪拌した後、反応を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(20 mL)で失活させ、ジクロロメタン(2x50 mL)を用いて抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(50 mL)で洗浄し、乾燥した(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン:メタノール(98:2)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、固体物(196 mg, 67%)として生成物204を得た(ジアステレオアイソマー～1.7:1の混合物)。

## 【0604】

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 7.36–7.14 (m, Bn, H-6), 5.77 (1H, d, J 7.9 Hz, H-1'), 5.57 (1H, d, J 5.8 Hz, H-1'), 4.68–4.43 (m, Bn, H-2'), 4.12–3.68 (m, H-5', H-5'', H-3'), 3.32 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.24 (s, OCH<sub>3</sub>), 1.93 (d, J 0.9 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.86 (d, J 1.1 Hz, CH<sub>3</sub>), 0.14 (s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.12 (s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

## 【0605】

<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 163.68, 163.55 (C-4), 151.58, 151.07 (C-2), 137.84, 137.74, 137.32 (Bn), 135.93, 135.10 (C-6), 128.57, 128.42, 128.41, 128.10, 127.95, 127.85, 127.77, 127.74 (Bn), 111.38, 111.01 (C-5), 86.89, 85.61, 85.40, 84.72, 83.40, 83.31, 82.10 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 75.20, 73.98, 73.62, 73.59, 72.55, 72.13, 71.04, 70.74 (Bn, C-5', C-5''), 56.82, 56.54 (OCH<sub>3</sub>), 12.47, 12.38 (CH<sub>3</sub>), 1.72, 1.69 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

## 【0606】

MS FAB: 555 (M+H, 65%), 577 (M+Na, 70%).

実測値: C, 62.76; H, 6.88; N, 4.94; C<sub>29</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Si の理論値 C, 62.79; H, 6

.90; N, 5.05 %.

### 【0607】

#### 実施例 112

(1R,2S,3S)-2-ベンジルオキシ-3-ベンジルオキシメチル-1-(メトキシ(6-N-ベンゾイルアデニン-9-イル)メチル)-3-トリメチルシリルオキシテトラヒドロフラン(205)。

無水アセトニトリル(8.2 mL)中の202(240 mg, 0.673 mmol)および6-N-ベンゾイルアデニン(301 mg, 1.26 mmol)の溶液にBSA(0.67 mL, 2.7 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。溶液を0°Cに冷却し、トリメチルシリルトリフレート(0.25 mL, 1.33 mmol)を滴加した。65°Cで18時間攪拌した後、反応を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(50 mL)で失活させ、ジクロロメタン(2×50 mL)で抽出した。合わせた抽出物を乾燥した(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン:メタノール(98:2)を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、固体物(185 mg, 41%)として生成物205を得た(ジアテレオアイソマー～1.8:1の混合物)。

### 【0608】

<sup>1</sup>H NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 8.78 (s, H-8), 8.21 (s, H-2), 8.17 (s, H-2), 8.03–8.00 (m, Bz), 7.61–7.49 (m, Bz), 7.36–7.23 (m, Bn), 7.07–7.04 (m, Bz), 5.85 (1 H, d, J 7.9 Hz, H-1'), 5.76 (1 H, d, J 6.0 Hz, H-1'), 4.74–4.40 (m, Bn, H-2'), 4.22–3.62 (m, H-5', H-5', H-3'), 3.33 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.24 (s, OCH<sub>3</sub>), 0.15 (s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 0.14 (s, Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

### 【0609】

<sup>13</sup>C NMR(CDCl<sub>3</sub>): δ 164.68 (HNC=O), 153.17, 152.99 (C-6), 149.47 (C-2), 141.82, 141.66 (C-8), 137.74, 137.71, 137.65 (Bn), 133.87, 132.87, 132.78 (Bz), 128.97, 128.93, 128.45, 128.42, 128.38, 128.14, 127.97, 127.88, 127.82, 127.78 (Bn, Bz), 123.66, 122.85 (C-5), 86.41, 86.23, 85.70, 85.24, 84.78, 83.73, 83.58, 82.79 (C-1', C-2', C-3', C-4'), 75.32, 74.55, 73.61, 72.18, 71.98, 70.85, 70.59 (Bn, C-5', C-5''), 57.23, 57.04 (OCH<sub>3</sub>), 1.78 (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

## 【0610】

MS FAB: 668 (M+H, 50%), 690 (M+Na, 100%).

実測値: C, 64.07; H, 6.01; N, 9.94;  $C_{29}H_{38}N_2O_7Si, 0.5H_2O$  の理論値 C, 63.88; H, 6.25; N, 10.34 %.

## 【0611】

## 実施例 113

(1R,2R,3R)-2-ベンジルオキシ-3-ベンジルオキシメチル-3-ヒドロキシテトラヒドロフルフラール(206)。

80% 酢酸(3.8 mL)中の 202/203 (252 mg, 0.707 mmol)の溶液を90°Cで2時間攪拌し、溶媒を減圧下で蒸留して除去した。残渣をトルエン(3x10 mL)中で共に蒸発させ、油として生成物206を得た(242 mg, 100%)。

## 【0612】

<sup>1</sup>H NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  9.66 (1 H, d,  $J$  0.8 Hz, H-1), 7.36–7.25 (10 H, m, Bn), 4.68 (1 H, d,  $J$  11.9 Hz, Bn), 4.60–4.39 (5 H, m, Bn, H-2, H-3), 3.98–3.92 (2 H, m, H-5), 3.85 (1 H, d,  $J$  9.3 Hz, H-5'), 3.52 (1 H, d,  $J$  9.2 Hz, H-5');

## 【0613】

<sup>13</sup>C NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  203.64 (C-1), 137.39, 137.19, 128.61, 128.54, 128.29, 128.12, 127.87, 127.83 (Bn), 87.17, 87.05 (C-4, C-2), 80.98 (C-3), 75.00, 73.70, 71.86 (Bn, C-5'), 67.84 (C-5);

MS FAB: 707 (2xM+Na, 100%).

## 【0614】

## 実施例 114

(1S,3S,4R,7S)-3-アセトキシ-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン(207)。

無水ピリジン(2.0 mL)中の 206 (230 mg, 0.672 mmol)の攪拌溶液に無水酢酸(0.18 mL, 1.91 mmol)を加えた。反応混合物を室温で23時間攪拌し、水(0.13 mL)を加え、溶媒を減圧下で蒸留して除去した。残渣をトルエン(3x10 mL)中で共に蒸発させ、ジクロロメタン:メタノール(99:1)を溶出液として用いたシリカゲル

カラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として生成物207を得た(56.7 mg, 23%);

【0615】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.38–7.26 (10 H, m, Bn), 6.00 (1 H, s, H-1), 4.68 (1 H, d, J 12.0 Hz, Bn), 4.62 (1 H, d, J 12.2 Hz, Bn), 4.60 (1 H, d, J 12.4 Hz, Bn), 4.56 (1 H, d, J 12.2 Hz, Bn), 4.17 (1 H, s, H-2), 4.14 (1 H, s, H-3), 4.01 (1 H, d, J 7.7 Hz, H-5'), 3.81–3.78 (3 H, m, H-5', H-5), 20.06 (3 H, s, COCH<sub>3</sub>);

【0616】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 169.18 (C=O), 137.92, 137.48, 128.52, 128.45, 128.03, 127.77, 127.73, 127.68 (Bn), 95.95 (C-1), 86.49 (C-4), 78.27, 76.58 (C-3, C-2), 73.65 (Bn), 72.26, 71.96 (Bn, C-5'), 65.49 (C-5), 20.98 (COCH<sub>3</sub>);

MS FAB: 407 (M+Na, 55%).

実測値: C, 68.80; H, 6.11; C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub>の理論値 C, 68.74; H, 6.29 %.

【0617】

実施例 115

(1S,3S,4R,7S)-3-(6-N-ベンゾイルアデニン-9-イル)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン (208)。

無水アセトニトリル (5.3 mL) 中のフラノース207 (167 mg, 0.434 mmol) より6-N-ベンゾイルアデニン (194 mg, 0.813 mmol) の溶液にBSA (0.43 mL, 1.76 mol) を加え、室温で1時間攪拌した。溶液を0°Cで冷却し、トリメチルシリルトリフレート (0.16 mL, 0.86 mmol) を滴加した。65°Cで2時間攪拌した後、反応を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液 (40 mL) で失活させ、混合物をジクロロメタン (2x 50 mL) で抽出した。合わせて抽出物を乾燥した(MgSO<sub>4</sub>)。溶媒を減圧下で除去し、残渣をジクロロメタン:メタノール (98:2) を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、固体として生成物208を得た(111 mg, 45%)。;

【0618】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 8.82 (1 H, s, H-8), 8.14 (1 H, s, H-2), 7.59–7.26 (15 H, m, Bz, Bn), 6.74 (1 H, s, H-1'), 4.92 (1 H, s, H-2'), 4.74–4.39 (4 H, m, Bn), 4.42 (1 H, s, H-3'), 4.19–4.10 (2 H, m, H-5''), 3.92 (1 H, d, J 11.8 Hz, H-5'), 3.88 (1 H, d, J 11.5 Hz, H-5');  
 MS FAB: 564 (M+H, 100%).

## 【0619】

## 実施例 116

メチル 2-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-D-リボフラノシド (209)。

無水ピリジン(4 mL)中の 201 (687 mg, 1.52 mmol)の攪拌溶液に無水酢酸(0.43 mL, 4.56 mmol)を0°Cで滴加した。反応混合物を室温で2日間攪拌し、炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(75 mL)で失活させ、ジクロロメタン(150 + 75 mL)で抽出した。合わせた抽出物を乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、溶媒を減圧下で蒸留して除去し、残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として生成物209を得た( $\beta : \alpha \sim 3:1$ , 750 mg, 100 %);

## 【0620】

MS FAB: 463 (M-OCH<sub>3</sub>, 100%), 517 (M+Na, 28%);

実測値: C, 58.53; H, 6.16; C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>Sの理論値 C, 58.29; H, 6.11 %.

## 【0621】

メチル 2-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル- $\beta$ -D-リボフラノシド (209 $\beta$ )。

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 7.36–7.18 (10 H, m, Bn), 5.27 (1 H, d, J 4.9 Hz, H-2), 4.88 (1 H, s, H-1), 4.55–4.44 (6 H, m, H-5', Bn), 4.35 (1 H, d, J 5.0 Hz, H-3), 3.73 (1 H, d, J 9.2 Hz, H-5), 3.38 (1 H, d, J 9.3 Hz, H-5), 3.30 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 2.95 (3 H, s, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.11 (3 H, s, OCCH<sub>3</sub>);

## 【0622】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 169.91 (C=O), 137.83, 137.28, 128.49, 128.44, 127.99, 127.87, 127.77 (Bn), 105.40 (C-1), 82.65, 81.05, 74.55, 73.62, 73.56, 71.86, 70.22 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-5', Bn), 55.03 (OCH<sub>3</sub>), 37.14 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

, 20.73 ( $\text{OCCH}_3$ )。

### 【0623】

メチル 2-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル- $\alpha$ -D-リボフラノシド (209 $\alpha$ )。

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  7.36–7.18 (10 H, m, Bn), 5.09 (1 H, d,  $J$  4.5 Hz, H-1), 4.95 (1 H, dd,  $J$  4.5, 6.8 Hz, H-2), 4.65–4.44 (6 H, m, H-5', Bn), 4.27 (1 H, d,  $J$  6.6 Hz, H-3), 3.49 (1 H, d,  $J$  9.9 Hz, H-5), 3.46 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.36 (1 H, d,  $J$  9.9 Hz, H-5), 2.92 (3 H, s, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.14 (3 H, s, OCH<sub>3</sub>);

### 【0624】

$^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  170.41 (C=O), 137.59, 137.28, 128.56, 128.51, 128.49, 128.44, 127.98, 127.88 (Bn), 102.35 (C-1), 84.25, 77.53, 74.66, 73.67, 72.12, 70.39, 70.28 (C-2, C-3, C-4, C-5, C-5', Bn), 56.07 (OCH<sub>3</sub>), 36.94 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 20.63 (OCCH<sub>3</sub>).

### 【0625】

#### 実施例 117

フェニル2-O-アセチル-3,5-ジ-O-ベンジル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-1-チオ- $\beta$ -D-リボフラノシド (210)。

#### 方法a。

無水ジクロロメタン(6.4 mL)中の209 (738 mg, 1.49 mmol)の攪拌溶液にフェニルチオトリメチルシラン(2.42 mL, 12.8 mmol)を加え、0°Cに冷却した。トリメチルシリルトリフレート (0.67 mL, 3.67 mmol)を滴加し、溶液を室温で4時間攪拌した。反応を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(100 mL)で失活させ、ジクロロメタン(2x200 mL)で抽出した。合わせた抽出物を乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、溶媒を減圧下で蒸留して除去した。残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として生成物210(564 mg, 66%)および未反応の出発材料(191 mg, 26%)を得た。

#### 方法b。

無水ジクロロメタン(0.49 mL)中の211 (86 mg, 0.165 mmol)の溶液に フェニル

チオトリメチルシラン(0.16 mL, 0.825 mmol)を加え、0℃に冷却した。トリメチルシリルトリフレート(0.037 mL, 0.206 mmol)を加え、溶液を室温で2時間攪拌した。反応を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(15 mL)で失活させ、得られた混合物をジクロロメタン(2×25 mL)で抽出した。合わせた抽出物を乾燥し( $MgSO_4$ )、溶媒を減圧下で蒸留して除去した。残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、透明の油として生成物210を得た(75 mg, 79%)。

#### 【0626】

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.47–7.19 (15 H, m, Bn, SPh), 5.48 (1 H, d,  $J$  3.6 Hz, H-2), 5.34 (1 H, dd,  $J$  3.7, 5.2 Hz, H-1), 4.54–4.36 (7 H, m, H-3, H-5', Bn), 3.66 (1 H, d,  $J$  9.7 Hz, H-5), 3.48 (1 H, d,  $J$  9.5 Hz, H-5), 2.89 (3 H, s,  $SO_2CH_3$ ), 2.09 (3 H, s,  $OCCH_3$ );

#### 【0627】

$^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  169.93 (C=O), 137.69, 137.08, 132.65, 132.45, 129.15, 128.53, 128.52, 128.18, 128.14, 128.08, 127.91, 127.85 (Bn, SPh), 87.99, 84.35, 80.34, 75.33, 74.20, 73.67, 70.83, 69.34 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-5', Bn), 37.27 ( $SO_2CH_3$ ), 20.68 ( $OCCH_3$ );

MS FAB: 463 (M-SPh, 100%), 595 (M+Na, 24%);

実測値: C, 61.17; H, 5.55;  $C_{22}H_{32}O_8S_2$  の理論値 C, 60.82; H, 5.63 %.

#### 【0628】

##### 実施例 118

1,2-ジ-0-アセチル-3,5-ジ-0-ベンジル-4-C-メタンスルホニルオキシメチル-D-リボフラノース(211)。

80%酢酸(1.5 mL)中の201(150 mg; 0.313 mmol)の溶液を90℃で3時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発して除去し、残渣をエタノール(3×5 mL)、トルエン(3×5 mL)およびピリジン(2×5 mL)と共に蒸発させた。残渣を無水ピリジン(0.62 mL)に溶解し、無水酢酸(0.47 mL)を加え、溶液を室温で16時間攪拌した。反応を水(50 mL)で失活させ、得られた混合物をジクロロメタン(2×50 mL)で抽出した。合わせた抽出物を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(50 mL)で洗浄し、乾燥した( $MgSO_4$ )

。溶媒を蒸発させ、残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、油として生成物211を得た(99 mg, 60%)；

### 【0629】

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)：δ 7.39–7.21 (m, Bn), 6.38 (d, J 4.6 Hz, H-1 <sub>β</sub>), 6.15 (s, H-1 <sub>α</sub>), 5.35 (d, J 4.9 Hz, H-2 <sub>α</sub>), 5.17 (dd, J 6.3, 4.9 Hz, H-2 <sub>β</sub>), 4.69–4.23 (m, H-3, Bn), 3.64 (d, J 9.7 Hz, H-5 <sub>α</sub>), 3.52 (d, J 10.1 Hz, H-2 <sub>β</sub>), 3.45 (d, J 9.7 Hz, H-5 <sub>α</sub>), 3.39 (d, J 9.9 Hz, H-2 <sub>β</sub>), 2.99 (s, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> <sub>α</sub>), 2.96 (s, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> <sub>β</sub>), 2.14, 2.13, 2.06, 1.90 (4xs, COCH<sub>3</sub>)；

### 【0630】

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>)：δ 169.68, 169.00 (C=O), 137.68, 137.05, 128.60, 128.55, 128.50, 128.21, 128.12, 128.04, 127.94, 127.82, 127.79 (Bn), 99.35 (C-1 <sub>α</sub>), 94.24 (C-1 <sub>β</sub>), 86.36 (C-4 <sub>β</sub>), 84.28 (C-4 <sub>α</sub>), 79.15, 77.47, 74.58, 74.06, 73.73, 73.56, 71.67, 70.57, 70.19, 69.84 (Bn, C-2, C-3, C-5, C-5'), 37.61 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> <sub>β</sub>), 37.48 (SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> <sub>α</sub>), 21.07, 20.74, 20.63, 20.39 (COCH<sub>3</sub>)；

### 【0631】

MS FAB: 545 (M+Na, 13%).

実測値: C, 57.70; H, 5.56; C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>10</sub>S の理論値 C, 57.46; H, 5.79 %.

### 【0632】

実施例 119

(3R)-および(3S)-(1S,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-フェニルチオ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン (212)。

アンモニアで飽和させたメタノール(35 mL)中の 210 (553 mg, 0.966 mmol)の溶液を室温で2時間攪拌し、溶媒を減圧下で蒸留して除去した。残渣を無水DMF (3.5 mL)に溶解し、0°Cで溶液を攪拌した。水素化ナトリウム60%懸濁液(118 mg, 2.88 mmol)を加え、混合物を室温で12時間攪拌した。反応を炭酸水素ナトリウム飽和水溶液(100 mL)で失活させ、得られた混合物をジクロロメタン (2x100 mL)で抽出した。合わせて抽出物を乾燥し(MgSO<sub>4</sub>)、溶媒を減圧下で蒸留して除去した。残渣をジクロロメタンを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラ

フィで精製し、透明の油として生成物212を得た(404 mg, 96%)。

### 【0633】

MS FAB: 435 (M+H, 35%), 457 (M+Na, 16%);

実測値: C, 71.76; H, 6.18;  $C_{26}H_{26}O_4S$  の理論値 C, 71.86; H, 6.03 %.

### 【0634】

(1S,3R,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-フェニルチオ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン ( $212\beta$ )。

### 【0635】

$^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.46–7.26 (15 H, m, Bn, SPh), 5.35 (1 H, s, H-1), 4.68–4.56 (4 H, m, Bn), 4.31 (1 H, s, H-2), 4.10 (1 H, s, H-3), 4.09 (1 H, d, J 7.3 Hz, H-5'), 3.93 (1 H, d, J 7.8 Hz, H-5'), 3.79 (2 H, m, H-5);

### 【0636】

$^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  138.03, 137.45, 133.42, 132.36, 129.19, 128.55, 128.46, 128.05, 127.84, 127.83, 127.76 (Bn, SPh), 89.96 (C-1), 87.18 (C-4), 79.71 (C-2), 79.40 (C-3), 73.64 (Bn), 73.23 (C-5'), 72.30 (Bn), 66.31 (C-5).

### 【0637】

(1S,3S,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-フェニルチオ-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン ( $212\alpha$ ).

### 【0638】

$^1H$  NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.52–7.19 (15 H, m, Bn, SPh), 5.52 (1 H, s, H-1), 4.70–4.50 (4 H, m, Bn), 4.41 (1 H, s, H-2), 4.18 (1 H, d, J 7.8 Hz, H-5'), 4.08 (1 H, d, J 8.4 Hz, H-5'), 4.07 (1 H, s, H-3), 3.78 (1 H, d, J 11.3 Hz, H-5), 3.72 (1 H, d, J 11.5 Hz, H-5);

### 【0639】

$^{13}C$  NMR (CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  137.89, 137.46, 135.29, 130.93, 129.13, 128.99, 128.57, 128.48, 127.81, 127.76, 127.58, 126.95 (Bn, SPh), 91.87 (C-1), 88.59 (C-4), 80.07, 79.14 (C-2, C-3), 73.65, 73.40, 72.04 (Bn, C-5'), 65.62 (C-5).

## 【0640】

## 実施例 120

(3R)- and (3S)-(1S,4R,7S)-7-ベンジルオキシ-1-ベンジルオキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン (36+213)。

チミン (175 mg, 1.38 mmol) をヘキサメチルジシラザン (6.8 mL) 中で還流させながら攪拌し、硫酸アンモニウム (5 mg) を加えた。16時間攪拌した後、透明の溶液を40°Cに冷却し、溶媒を減圧下で蒸留して除去した。残渣に無水ジクロロメタン (4.6 mL) 中の 212 (201 mg, 0.463 mmol) 溶液および4Åモレキュラーシーブス (180 mg) を加えた。室温で10分間攪拌した後、NBS (107 mg, 0.602 mmol) を加え、混合物をさらに30分間攪拌した。反応をチオ硫酸ナトリウム飽和水溶液 (2.5 mL) で失活させ、得られた混合物をジクロロメタン (2x50 mL) で抽出した。合わせた抽出物を乾燥し ( $MgSO_4$ )、蒸発し、残渣をジクロロメタン:メタノール (97:3) を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製し、アノマーミキシ物 ( $\beta : \alpha \sim 1:2$ ) として生成物 36+213 を得た (127 mg, 61%)；

## 【0641】

$^1H$  NMR ( $CDCl_3$ ):  $\delta$  7.49 (d,  $J$  0.9 Hz, H-6  $\beta$ ), 7.46 (d,  $J$  1.0 Hz, H-6  $\alpha$ ), 7.39–7.25 (m, Bn), 5.94 (s, H-1'  $\alpha$ ), 5.64 (s, H-1'  $\beta$ ), 4.71–4.50 (m, Bn, H-2'), 4.23 (s, H-3'  $\alpha$ ), 4.16 (d,  $J$  8.6 Hz, H-5''  $\alpha$ ), 4.09–3.78 (m, H-5', H-5'', H-3'  $\beta$ ), 1.94 (d,  $J$  0.9 Hz,  $CH_3$   $\alpha$ ), 1.62 (d,  $J$  1.2 Hz,  $CH_3$   $\beta$ );

MS FAB: 551 (M+H, 96%).

## 【0642】

## 実施例 121

(3R)- および(3S)-(1S,4R,7S)-7-ヒドロキシ-1-ヒドロキシメチル-3-(チミン-1-イル)-2,5-ジオキサビシクロ[2.2.1]ヘプタン (37+214)。

エタノール (2.7 mL) 中の 36+213 (175 mg, 0.39 mmol) の溶液を室温で攪拌し、炭素上の20%水酸化パラジウム (50 mg) を加えた。混合物をアルゴンで数回脱ガスし、水素雰囲気下に置いた。18時間攪拌した後、混合物をジクロロメタン:メタノール (95:5) を溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製

し、37と214の混合物を得た(1:1.2) (26 mg, 25%);

#### 【0643】

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 7.78 (d, J 1.3 Hz, H-6<sub>α</sub>), 7.73 (d, J 1.2 Hz, H-6<sub>β</sub>), 5.88 (s, H-1'<sub>α</sub>), 5.53 (s, H-1'<sub>β</sub>), 4.38 (s, H-2'<sub>α</sub>), 4.34 (s, H-3'<sub>α</sub>), 4.26 (s, H-2'<sub>β</sub>), 4.08-3.69 (m, H-5', H-5'', H-3'<sub>β</sub>), 1.92 (d, J 1.2 Hz, CH<sub>3</sub><sub>α</sub>), 1.88 (d, J 1.1 Hz, CH<sub>3</sub><sub>β</sub>);

#### 【0644】

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): δ 138.00 (C-6<sub>α</sub>), 136.96 (C-6<sub>β</sub>), 110.80 (C-5<sub>β</sub>), 110.08 (C-5<sub>α</sub>), 92.49, 89.01 (C-4', C-1'<sub>α</sub>), 90.46, 88.37 (C-4', C-1'<sub>β</sub>), 80.89, 74.27, 73.34 (C-2', C-3', C-5'<sub>α</sub>), 80.59, 72.47, 70.39 (C-2', C-3', C-5'<sub>β</sub>), 59.29 (C-5''<sub>α</sub>), 57.61 (C-5''<sub>β</sub>), 12.52 (CH<sub>3</sub><sub>α</sub>), 12.39 (CH<sub>3</sub><sub>β</sub>);

MS EI: 270 (M+, 100%).

#### 【0645】

LNA ホスホロアミダイトの生成

#### 実施例 122

4-N-ベンゾイル-LNA-C [(1R, 3R, 4R, 7S)-3-(4-N-ベンゾイルシトシン-1-イル)-1-(ヒドロキシメチル)-7-ヒドロキシ-2,5-ジオキサビシクロ [2.2.1] ヘプタン]。

LNA-C (式 Z) を無水エタノールに入れ、還流させながら熱した。還流溶液に無水安息香酸(2等量)を加え、反応をHPLC(溶出駆: 0.1M TEAA中20%アセトニトリル pH 7.0, 流量: 1ml/分、Novapak C-18 分析用カラム)で追跡した。HPLCで生成物の増加が見られなくなるまで0.5~2h間隔でさらに無水物を加えた。反応混合物をロータリーエバポレーターで濃縮した。残渣をエーテルで繰り返し洗浄し、濾過し、乾燥してオフホワイト色の固体を得た。収量: 45%.

#### 【0646】

塩基が保護されたLNAヌクレオシド (LNA-C<sup>0z</sup>, LNA-T, LNA-G<sup>1Bz</sup>, LNA-A<sup>3z</sup>)のジメトキシトリチル化の一般的方法。

塩基が保護されたLNAヌクレオシドをピリジン (2x)と共に蒸発させ、ピリジン

(~10 ml/ヌクレオシドの9)中で塩化ジメトキシトリチル(1.5等量)と攪拌した。反応をHPLC (0.1M TEAA中50% アセトニトリル pH 7.0、5分間、10分間で50–100% アセトニトリル、5分間で100% アセトニトリル、流量: 1 ml/分、Novapak C-18 カラム)で追跡した。出発材料の>95%が反応すると、反応混合物を水中で冷却した。反応を冷たい飽和NaHCO<sub>3</sub> (~15 ml × ピリジンの容量)を加えて失活させた。混合物をジクロロメタン (3 × 重炭酸ナトリウムの容量の半分)で抽出した。有機抽出物をあわせ、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。残渣を真空中で乾燥し、ジクロロメタン中の0.5% ピリジンおよび0–2% メタノールを溶出液として用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィで精製した。純粋な生成物を含む画分をあわせ、ロータリーエバポレーターで濃縮した。残渣を無水アセトニトリル (3x)と共に蒸発させ、真空中で乾燥した。

#### 【0647】

保護された LNA ヌクレオシドのホスファイト化の一般的な方法。

塩基が保護されたジメトキシトリチル-LNA ヌクレオシドを無水ジクロロメタン (2x)と共に蒸発させ、無水ジクロロメタン (A,G & T のヌクレオシドには10 ml/g、およびCには~30 ml/g)に入れた。このビス(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエチル)ホスファイト(1.05–1.10 等量)に、テトラゾール(0.95 等量)を加えた。混合物を室温で攪拌し、次いで反応をHPLC (0.1M TEAA 中70% アセトニトリル、pH 7、2分間、8分間で70–100% アセトニトリル、5分間で100% アセトニトリル 流量: 1 ml/分、Novapak C-18 カラム)で追跡した。いったん反応が>90% まで進み、さらに攪拌してもアミダイト生成に増加が見られなくなると、混合物を水中で冷却する。これをジクロロメタン (元の容量の~15–20 倍)で希釈し、冷たい飽和重炭酸ナトリウム (2x)で洗浄し、次いで冷ブライン(1x)で洗浄する。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。残渣を無水アセトニトリル (3x)と共に蒸発させ、真空中で一晩乾燥した。HPLC純度は 93–98%であった。

#### 【0648】

LNA ヌクレオシド 5'-トリホスフェートの生成

実施例 123

LNA ヌクレオシド 5'-トリホスフェートの合成。(Tetrahedron Letters 1988, 29 4525)。

13x100 mm のポリプロピレンチューブ内に1 mLピリジン(CaH<sub>2</sub>で乾燥)にヌクレオシド37、44, 51, 4-N-ベンゾイル化 57A または 61B (93.8 μmol)を懸濁した。溶液を高真空中にて乾燥するまでスピードバック (speedvac) で蒸発させた。残渣をアセトニトリル (CaH<sub>2</sub>で乾燥)に2回再懸濁し、蒸発乾固させた。ヌクレオシドを 313 μL のトリメチルホスフェート(4Å モレキュラーシーブスで乾燥)に懸濁し、そこへ30.1 mgのプロトンスponジ (Proton Sponge) (商標) (1.5等量)を加えた。混合物を密閉し、攪拌し、0°Cに冷却し、POCl<sub>3</sub> (9.8 μL, 1.1等量)を攪拌しながら加えた。反応を0°Cで2.5時間進行させた。この期間中、5 mLの水に469 μmolsのピロリン酸ナトリウム(5 等量)を溶解し、5 mLのDow 50 H イオン交換樹脂に通過させた。排水が酸性に変わったらこれを220 μLのトリプチルアミン中に集め、シロップ状になるまで蒸発させた。TBAピロリン酸を乾燥アセトニトリルと共に3回蒸発させた。最後に乾燥ピロリン酸を1.3 mL DMF (4Å シーブス)に溶解した。2.5時間の反応時間後、TBAピロリン酸および130 μLのトリプチルアミンをヌクレオシド溶液に激しく攪拌しながら加えた。1分後、反応を3 mLの0.1 M 酢酸トリメチルアンモニウム、pH 7.5を加えて失活させた。Mono Q クロマトグラフィによるアッセイにより、49%のヌクレオシド 5'-トリホスフェートが見られた。反応混合物を水で100 mLに希釀し、Qセファロースイオン交換カラムに吸収させ、水で洗浄し、5 mM 硫酸ナトリウム中の0~700 mM NaCl、pH 7.5の線勾配で溶出させた。トリホスフェートを含む画分をMono Q イオン交換クロマトグラフィでアッセイした。トリホスフェートを含む画分をプールし、NaCl飽和点まで濃縮した。生成物をC18カートリッジで脱塩した。トリホスフェートをUV 分光法で数値化し、10 mM 溶液に調整した。収量は17~44%であった。この方法で調製したLNA ヌクレオシドは U, T, A, GおよびCであった。

### 【0649】

LNA 修飾オリゴヌクレオチドの調製

実施例 124

式 V, X, Y および Z<sup>r</sup>, Z<sup>d</sup>, Z<sup>e</sup>, Z<sup>s</sup>, Z<sup>a</sup>, Z<sup>ac</sup> のLNAを含むオリゴヌクレオチド

の合成。

二環式スクレオシド 3'-O-ホスホロアミダイト類似体8, 19, 30, 39, 46, 53, 57D, 61D, および66ならびに市販の3'-O-ホスホロアミダイトを、タイプV, X, Y ならびに Z<sup>t</sup>, Z<sup>d</sup>, Z<sup>c</sup>, Z<sup>e</sup>, Z<sup>a</sup>, および Z<sup>m,c</sup>のLNAを1つ以上含む本発明のLNA オリゴスクレオチドの例を合成するために使用した(0.2 ~ 5 $\mu$ mol スケール)。合成したLNA オリゴスクレオチドの純度および組成は毛管ゲル電気泳動および/またはHPLCおよび/またはMALDI-MSで確認した。一般的に、十分な結合効率は全てのモノマーで得られた。最良の結合効率(~95-100%)は LNA39, 46, 53, 57D, 61Dおよび66 (式ZのLNAモノマーへ導く)で得られ、完全修飾LNAオリゴスクレオチドを生成する際、またはLNAを非修飾DNAまたはRNA鎖またはLNAを全-ホスホロチオエートオリゴスクレオチドに組み込む際に非常に満足のいく結果を生じさせる。LNAオリゴスクレオチドを純水に溶解させ、濃度をOD<sub>260</sub>として測定する。可溶性は全ての場合において良好であった。単純な DNA/RNA 合成および部分修飾LNAオリゴマーにおいては、標準CPG支持体またはポリスチレン支持体を使用する。完全修飾LNA

#### 【0650】

#### 【化19】

オリゴマー (例えば 5'-d(GTGATATGC)-3')

#### 【0651】

を合成する際には BioGenex Universal CPG 支持体(BioGenex, U.S.A.) またはLNA 誘導化支持体を使用する。)

#### 【0652】

#### 実施例 125

ホスホロチオエート LNA オリゴスクレオチドの合成。

全てのホスホロチオエート LNA (表7)を自動DNAシンセサイザーにて上記と同様の条件(実施例 124)で合成した。Beaucages' 試薬を硫化剤として使用した。段階的結合により、収量>98%を得た。合成終了後、固体支持体からの脱保護および開裂は濃縮アンモニア(55℃, 14時間)を用いて効果的に行った。

## 【0653】

## 実施例 126

2'-チオ-LNA オリゴヌクレオチドの合成。

2'-thio-LNAオリゴヌクレオチド(モノマーU<sup>S</sup>を含む(図2の式Z(チオ-変異体))、図37、表8)を標準条件を用いて(実施例 124)自動DNAシンセサイザーで合成した。段階的結合により、アミダイト76Fの収量は約85% (12分間結合;上昇したアミダイト76Fの純度は結合収量の増加をもたらすと考えられる)であった。合成終了後、固体支持体からの脱保護および分割は濃縮アンモニア(55 ℃, 8時間)を用いて効果的に行なった。

## 【0654】

## 実施例 127

2'-アミノ-LNA オリゴヌクレオチドの合成。

実施例126に記載のと同様の手順により、2'-アミノ-LNA オリゴヌクレオチド(モノマーT<sup>NH</sup>およびモノマーT<sup>NH<sub>2</sub></sup>を含む(図2の式Z(アミノ変異体)),図35および36)をアミダイト74A および74Fを用いて自動DNAシンセサイザーで効果的に得た(段階結合収量≥98%)。

## 【0655】

## 実施例128

LNAオリゴマーのフルオレセイン標識。

## 【0656】

## 【化20】

LNAオリゴマー(図2の式Z) AL16 (5'-d(TGTGTGAAATTGTTAT)-3'; 太字はLNAヌクレオチド) およびAL17 (5'-d(ATAAAGTGTAAAG)-3'; 太字はLNAヌクレオチド)

## 【0657】

を製造者(Promega)の記載にしたがってFluoroAmp T4キナーゼ緑色オリゴヌクレオチド標識システムでフルオレセインを用いて首尾よく標識した。簡単に、16 n mol のLNA-オリゴマー AL16またはAL17のどちらかをT4キナーゼおよびγ-S-ATP

を含む  $50 \mu\text{l}$  の反応緩衝液中で 5'-チオホスフェート標識した。反応を  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートした。チオリン酸化 LNA オリゴは  $5 \mu\text{l}$  のオリゴヌクレオチド沈殿剤 (Promega) および  $165 \mu\text{l}$  の氷冷 ( $-20^\circ\text{C}$ ) 95 % エタノールを加えて析出させた。遠心分離した後、ペレットを  $500 \mu\text{l}$  の氷冷 ( $-20^\circ\text{C}$ ) 70% エタノールで一回洗浄し、 $25 \mu\text{l}$  の PBSE 緩衝液に再び溶解した。調製したばかりの 5-マレイミド-フルオレセイン溶液 ( $5 \mu\text{l}$  DMSO 中  $50 \mu\text{g}$ ) をチオリン酸化 LNA オリゴに加え、反応混合物を  $68^\circ\text{C}$  で 30 分間インキュベートした。5-マレイミド-フルオレセイン ( $5 \mu\text{l}$  DMSO 中  $50 \mu\text{g}$ ) をそれぞれの LNA オリゴにさらに加え、反応混合物をさらに 60 分間インキュベートした。インキュベート後、 $10 \mu\text{l}$  のオリゴヌクレオチド析出物を各反応混合物に加え、次いで  $180 \mu\text{l}$  の氷冷 ( $-20^\circ\text{C}$ ) および  $100 \mu\text{l}$  の N,N-ジメチルホルムアミドを加えた。フルオレセイン標識した LNA オリゴを遠心分離で分離し、次いで上澄を吸引除去した。フルオレセイン標識した LNA オリゴマーを逆相 HPLC で次のように精製した：カラム Delta-Pack C-18, 300A,  $0.4 \times 30 \text{ cm}$ ；溶出液  $0.04 \text{ M}$  トリエチルアンモニウム緩衝液 (pH 7.0) 中 0–50 % アセトニトリル；流量  $1.5 \text{ ml}/\text{分}$ 。LNA オリゴを含む画分をプールし、減圧下で 1–2 時間蒸発させた（オイルポンプおよびスピードバック システム）。

### 【0658】

ハイブリッド化データ

#### 実施例 129

式 V, X, Y および Z<sup>t</sup>, Z<sup>d</sup>, Z<sup>e</sup>, Z<sup>f</sup>, Z<sup>a</sup>, Z<sup>b</sup><sup>c</sup> のモノマーを含むオリゴヌクレオチドの耐熱性。

LNA 修飾オリゴヌクレオチドの耐熱性を温度調節されたペルチエ エレメント (Pereltier element) を備えた分光光度計で測定した。3 つの異なる緩衝液 ( $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0,  $100 \text{ mM NaCl}$ ,  $0.1 \text{ mM EDTA}$ ;  $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0,  $0.1 \text{ mM EDTA}$ ;  $3 \text{ M}$  テトラメチルアンモニウムクロリド (TMAC),  $10 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0,  $0.1 \text{ mM EDTA}$ ) のいずれか、および等モル ( $1 \mu\text{M}$  または  $1.5 \mu\text{M}$ ) 量の異なる LNA 修飾オリゴヌクレオチドおよびその相補的またはミスマッチ DNA または RNA オリゴヌクレオチドを含むハイブリッド混合物  $1 \text{ ml}$  を調製した。同一のハイブリッド混合物を非修飾オリゴヌクレオチドを用いて基準として調製した。Tm's を最初の誘導体

の融解曲線として得た。表1~4に結果を要約する(LNAは太字で表す)。図2に使用したモノマーLNAを示す。V, X, Yおよび $Z^r$ ,  $Z^u$ ,  $Z^e$ ,  $Z^a$ ,  $Z^{ne}$ の命名は図2のV, X, YおよびZの構造を参照する。表中、LNAモノマーの核塩基をインキュベートした。さらに、最後の2つの表のLNA構造Zのチオおよびアミノ変異体について使用した命名はそれぞれ例えば $Z^s$ および $Z^{NH}$ であった。

### 【0659】

構造Zを含むLNAを特に徹底的に試験した(表1参照)。3つの $Z^r$ 残基を混合配列オリゴヌクレオチドに組み込むときは、相補的DNA(10)およびRNA(16)オリゴヌクレオチドの両方についてNaCl緩衝液中で得られたTm's(修飾毎に対してRNA: 約7°C DNA: 約5°C)は、非修飾オリゴヌクレオチド(1および8)の対応する二重らせんのTmよりも実質的に高かった。同様の結果が2つの $Z^r$ 残基および $Z^e$ (21および24B)または $Z^u$ (25)のいずれか1つ、 $Z^a$ (69),  $Z^{ne}$ (65), ならびに $Z^s$ (58)残基を含むLNAからも得られた。標的RNAまたはDNAオリゴヌクレオチドにミスマッチが導入されるときは、LNA修飾オリゴヌクレオチドのTmは全ての場合において顕著な低下を示し(11-15Aおよび17; 18-20および22-24A; 26-31; 57および59-60; 63-64および66, ならびに67)、ワトソン-クリック水素結合法則に従ってLNA修飾オリゴヌクレオチドが標的配列にハイブリッドすることが明白に証明される。全ての場合において、ミスマッチの導入によるLNA修飾オリゴヌクレオチドのTmの低下が対応する非修飾オリゴヌクレオチド(2-7および9; 33-38)のそれと同等かまたはそれよりも大きいことは、LNA修飾オリゴヌクレオチドが少なくともその天然の対応物と同じくらい特異的であることを示している。ハイブリッド化緩衝液のイオン強度の低下(10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 100mM NaCl, 0.1mM EDTAから10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.0, 0.1mM EDTA)により、相補的DNAオリゴ(40, 41)またはRNAオリゴヌクレオチド(40A, 41A)についてのLNA修飾オリゴヌクレオチドのTmが低下する。同様の効果が非修飾オリゴヌクレオチドおよびその相補的DNAオリゴ(39)またはRNAオリゴ(39A)について見られる。

### 【0660】

3Mテトラメチルアンモニウムクロリド(TMAC)をハイブリッド化緩衝液に加えることにより、相補的DNAオリゴ(10, 21, 25)についてのLNA修飾オリゴヌクレオチド

のT<sub>m</sub>が顕著に増加する。さらに、TMACがNaCl緩衝液中で見られる異なるオリゴヌクレオチドのT<sub>m</sub>の差 (TMAC中で56°Cおよび57°Cに対し、NaCl緩衝液中で最低T<sub>m</sub> 44°C、最高49°C)を均一化する。ミスマッチの導入により、DNA標的(11-13, 18-20および26-28)についてのLNA修飾オリゴヌクレオチドのT<sub>m</sub>が顕著に低下する。同様の情況が非修飾の基準オリゴヌクレオチド(1-4および32-35)において現れる。

### 【0661】

低塩緩衝液のデータより、LNA修飾オリゴヌクレオチドが正常オリゴヌクレオチドと同様、ハイブリッド化緩衝液のイオン強度に対する感度を示すことが示される。TMAC緩衝液のT<sub>m</sub>データから、TMACがLNA修飾オリゴヌクレオチドに対して、正常DNAオリゴヌクレオチドに対する効果と同様のT<sub>m</sub>等化効果を示すと推論される。LNA修飾オリゴヌクレオチドは両方のハイブリッド化緩衝液において完璧な特異性を保持する。

### 【0662】

4つのモノマー全てを含む完全修飾LNAオリゴヌクレオチド(71および75)、Z'およびZ<sup>1</sup>の両方を含むほぼ完全な修飾LNAオリゴヌクレオチド(41および41A)(3'-末端DNAヌクレオシドを除く)、ならびにZ'およびZ<sup>1</sup>の中心プロックを含む部分修飾オリゴヌクレオチド(40および40A)もまた、非修飾の対照オリゴヌクレオチド(39および39A; 1および8)に比較して実質的に増大した親和性を示す。これにより式ZのLNAが完全および部分修飾オリゴマーの両方の調製において非常に有用であることがわかる。我々はほぼ完全な修飾オリゴマー(41および41A)が相補的RNA(>93°C)およびDNA(83°C)の両方について無比の高親和性を示すことに注目する。同様の極端な親和性(RNAおよびDNAの両方について)がZ'のみを含むほぼ完全な修飾LNAオリゴマー(表1: 52および53)および完全修飾LNAオリゴマー(71および75)について見られる。部分修飾ポリ-Tオリゴヌクレオチドの親和性は、組み込まれるZ'モノマーの位置および数に依存する(44-51)。しかしながら全ての場合において、RNA標的のT<sub>m</sub>'s (45, 47, 49および51)は、DNA標的(46)で低いT<sub>m</sub>を示す対応する非修飾オリゴヌクレオチド(43)よりも高かった。3つのZ'残基を含む混合配列オリゴヌクレオチドは非修飾の基準オリゴヌクレオチド(1および8)と比較して、DNA(10)およびRNA標的(16)について実質的に高い親和性を示したため、ワトソン

-クリック以外の他の結合モチーフ(例えばフーグスティーン結合モチーフ)はポリ-Tオリゴヌクレオチドに対して開放性であること、またこれら結合モチーフは修飾オリゴヌクレオチドの正確な構造に対してある程度感受性であることを示唆している。全ての場合において、单塩基ミスマッチを完全Z'修飾ポリ-TオリゴヌクレオチドとDNA標的(54-56)の間の複合体に導入することにより、Tmの顕著な低下が生じる。

#### 【0663】

構造V(表2)、X(表3)およびY(表4)のLNAのいずれかを含むオリゴヌクレオチドを完全および部分修飾ポリ-T配列を考慮して分析した。構造VおよびYの完全修飾オリゴヌクレオチドは非修飾オリゴヌクレオチド(表1, 42および43)と比較して、RNA(表2, 14および表4, 14)およびDNA(表2, 13および表4, 13)標的の両方についてTmの増加を示した(Z'修飾オリゴヌクレオチドよりはるかに低いにもかかわらず)。構造VおよびYのモノマーを含む部分修飾オリゴヌクレオチドはZ'を含む部分修飾オリゴヌクレオチドと同様に機能した。これは上記にて説明した配列のホモポリマー特性によるものと思われる。Xを含むオリゴヌクレオチドは全ての場合において基準のDNAオリゴヌクレオチドと比較してさらに低いTmを示した。

#### 【0664】

##### 実施例 130

逆平行および平行配向の両方において、完全修飾LNAオリゴヌクレオチドは相補的DNAで安定なハイブリッドを形成する。

完全修飾LNAオリゴヌクレオチドを逆平行および平行配向の両方において相補的DNAにハイブリッド化した。ハイブリッド化溶液(1 mL)は10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(pH 7), 100 mM NaClおよび0.1 mM EDTAおよびそれぞれ1 μMの2つのオリゴヌクレオチドを含む。表1に示すように、逆平行(71)および平行結合配向(77)の両方は安定な二重らせんを形成する。逆平行は明らかに2つのうちで最も安定している。しかしながら、平行二重らせんでも非修飾DNAオリゴヌクレオチドの対応する逆平行二重らせんよりはるかに安定である(表1, 1)。

#### 【0665】

### 実施例 131

LNAモノマーは、相補的核酸についてのRNAオリゴマーの親和性を増加するために使用することができる。

3つのLNA-Tモノマー( $Z^T$ )を含む9-量体 RNAオリゴヌクレオチドと相補的DNAまたはRNAオリゴヌクレオチドとの間の複合体の耐熱性を分光光度で測定した。10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0, 100mM NaCl, 0.1mM EDTA およびそれぞれ $1\mu\text{M}$ の2つのオリゴヌクレオチドを含むハイブリッド化溶液(1ml)。非修飾RNAオリゴヌクレオチドを用いた同一のハイブリッド混合物を基準として測定した。表5に示すように、LNA修飾RNAオリゴヌクレオチドは相補的DNA(1)およびRNA(3)オリゴヌクレオチドの両方にハイブリッドする。先にLNA修飾DNAオリゴヌクレオチドについて見られたように、LNA修飾RNAオリゴヌクレオチドの結合親和性はRNA相補体(3)に対して最も強かった。両方の場合においてLNA修飾RNAオリゴヌクレオチドの親和性は実質的に非修飾の対照(2および4)のそれよりも高かった。表5により、DNAおよびRNA標的にの両方に対する特異性がLNA修飾RNAオリゴヌクレオチド中に保持されていることがわかる。

### 【0666】

### 実施例 132

LNA-LNA塩基対。

3つの $Z^T$  LNAモノマーまたはLNA Zモノマーから全て構成されるオリゴヌクレオチドを含むRNAまたはDNAオリゴヌクレオチドを相補的非修飾DNAオリゴヌクレオチドまたは3つの $Z^A$  LNAモノマーを含むDNAオリゴヌクレオチドにハイブリッドした。ハイブリッドの $T_m$ は分光光度で測定した。10mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0, 100mM NaCl および0.1mM EDTA およびそれぞれ $1\mu\text{M}$ の2つのオリゴヌクレオチドを含むハイブリッド化溶液(1ml)。表6に示すように、全てのLNA修飾オリゴヌクレオチドは相補的非修飾DNAオリゴヌクレオチド(2および3)および相補的LNA修飾オリゴヌクレオチド(4, 5および6)にハイブリッドした。先に見られたように、ハイブリッド(2および3)中の1つの鎖中のLNAモノマーの存在により非修飾の対照ハイブリッド(1)と比較して $T_m$ が顕著に増加する。ハイブリッド中のLNA-LNA塩基対の存在により $T_m$ がさらに増加する(4および5)。さらに、完全修飾LNAオリゴヌクレ

オチドおよび部分LNA-Z'修飾DNAオリゴヌクレオチド(6)の間で高安定ハイブリッドを形成することができる。これによりハイブリッド中のLNA-LNA塩基対の第1の例が構成される。

### 【0667】

#### 実施例 133

LNA 全-ホスホロモノチオエート オリゴヌクレオチドでは相対的に相補的DNAおよびRNAに対する耐熱性が、対応する全-ホスホロチオエート DNA オリゴヌクレオチドよりも減少しない。

3つのZ' LNA モノマーを含む全-ホスホロモノチオエート DNA オリゴヌクレオチド(LNAオリゴヌクレオチド)および対応する全-ホスホロモノチオエート 基準DNAオリゴヌクレオチドの相補的DNAおよびRNAに対する耐熱性を、EDTAを使用しないこと以外は実施例132に記載の条件と同一の条件下で評価した(表7)。3つのZ' LNA モノマーを含むLNA 全-ホスホロモノチオエート オリゴヌクレオチドは対応する基準 LNA オリゴヌクレオチド(表1, 10および16)と比較して、耐熱性においてわずかな減少を示した(表7, 3および4)。対応する全-ホスホロモノチオエート DNA オリゴヌクレオチド(表7, 1および2)は対応する基準DNA オリゴヌクレオチド(表1, 1および8)と比較して、耐熱性において顕著な減少を示した。これはアンチセンスにおける全-または部分的ホスホロモノチオエート LNA オリゴヌクレオチドの使用および他の治療的使用への重要な起りうる影響を有する。したがって、LNAモノマーおよび非修飾モノマーのホスホロモノチオエート オリゴヌクレオチドでの適合性が証明された。このような構造がLNA増強ハイブリッド特性に加え、RNaseリボヌクレアーゼ H 活性およびヌクレアーゼ耐性を示すことが考えられる。

### 【0668】

#### 実施例 134

2'-チオ-LNAはLNA(モノマーZ)に匹敵する核酸認識特性を示す。

ハイブリッド条件はEDTAを使用しないこと以外は実施例132に記載の条件と同様であった。2'-チオ-LNA(表8)の結果は2'-チオ-LNAモノマー<sup>b</sup>(メチレンオキシ架橋がメチレンチオ架橋で置換されている図2の式Zに対応するモノマー)の導入に

よるDNAおよびRNAの両方に対する二重らせんの耐熱性における正の効果を明確に示している。この効果( $\Delta T_m \sim +5^\circ\text{C}$  / DNAへの修飾;  $\Delta T_m \sim +8^\circ\text{C}$  / RNAへの修飾)は親LNAで見られる効果に匹敵する。情況は2つの修飾を同時に導入することにより複雑になった(2'-チオ官能性およびチミンのかわりのウラシル)。しかし、LNAチミンとウラシルモノマーで同一の融点が先にみられ、かつチミンのかわりに2'-デオキシリジンを含む基準のように、 $T_m$ 値を減少させるのであれば、この比較は意義がある。

### 【0669】

#### 実施例 135

2'-アミノ-LNA(モノマー-Z<sup>NNH</sup>)および2'-メチルアミノ-LNA(モノマー-Z<sup>NNMe</sup>)は親LNA(モノマー-Z)に匹敵する核酸認識特性を示す。

ハイブリッド化条件はEDTAを使用しないこと以外は実施例132に記載の条件と同様であった。2'-アミノ-LNAを溶融した結果(表9)は2'-アミノ-LNAモノマー-T<sup>NH</sup>またはT<sup>NNMe</sup>のいずれか(メチレンオキシ橋かけがメチレンアミノ橋かけまたはメチレン-(N-メチル)アミノ橋かけでそれぞれ置換されている図2の式Zに対応するモノマー)を導入することによるDNAおよびRNAの両方に対する二重らせんの耐熱性における正の効果を明確に示している。この効果( $\Delta T_m \sim +3^\circ\text{C}$  / DNAへの修飾および $\Delta T_m \sim +6 \sim +8^\circ\text{C}$  / RNAへの修飾)は親LNAの効果に匹敵する。増大した熱親和性が2'-アルキルアミノ-LNAモノマーおよび非アルキル化2'-アミノ-LNAモノマーの混合物からなるオリゴにおいても見られることは注目に値する。

### 【0670】

#### 酵素の基質としてのLNAおよびLNA修飾オリゴヌクレオチド

### 【0671】

#### 実施例 136

オリゴマー-5'-V<sub>1,3</sub>Tおよび5'-Z<sub>1,3</sub>Tの3'-エキソ核酸分解性(Exonucleolytic)安定性。

2 mlの緩衝液(0.1 M Tris-HCl, pH 8.6, 0.1 M NaCl, 14 mM MgCl<sub>2</sub>)中のオリゴヌクレオチド(0.2 OD)溶液を25°Cで1.2 U SVPDE(ヘビ毒ホスホジエステラーゼ)を用いて温浸した。温浸中、260 nmで吸収度の増加が生じた。非修飾の対照T<sub>1,4</sub>

は10分の分解で完全に分解されたが、5'-Z<sub>1,3</sub>Tおよび5'-V<sub>1,3</sub>Tは60分間変化しないままであった。

## 【0672】

## 実施例 137

T4 ポリヌクレオチドキナーゼの基質としてのLNA修飾オリゴ。

## 【0673】

## 【化21】

20 pmole の各プライマー(FP2: 5'-GGTGGTTTGTGTTG-3'; DNA プローブ), (AL2: 5'-GGTGGTTTGTGTTG-3', 太字は LNA ヌクレオシド) および (AL3: 5'-GGTGGTTTGTGTTG-3', 太字は LNA ヌクレオシド)

## 【0674】

をT4 ポリヌクレオチドキナーゼ (5ユニット; New England Biolabs)と70 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM ジチオトレチオールを含む緩衝液(最終容量20 μl)中の6 μl γ-<sup>32</sup>P ATP (3000 Ci/mmol, Amersham)と混合した。試料を37°Cで40分間インキュベートし、次いで65°Cで5分間熱した。各反応に2 μlのtRNA (1 μg/μl), 29 μlの3M酢酸アンモニウムおよび100 μlのエタノールを加えた。反応を-20°Cで30分間インキュベートし、標識オリゴを15000gで30分間遠心分離して析出させた。ペレットを20 μl のH<sub>2</sub>Oに再び懸濁した。試料(1 μl)をローディング緩衝液(ホルムアミド(pH 8.0), 0.1 %キシレンシアノール FF, 0.1 %ブロモフェノールブルーおよび10 mM EDTA)と混合し、TBEランニング緩衝液(90 mM Tris-HCl (pH 8.3), 90 mM ホウ酸および 2.5 mM 2ナトリウムEDTA-2 H<sub>2</sub>O)中の変性ポリアクリルアミドゲル(16 % アクリルアミド/ビスアクリルアミド溶液, 7 M尿素, 1 X TBE および0.1 mM EDTA)で電気泳動させた。ゲルをゲル乾燥器(Bio Rad model 583)で乾燥し、X線フィルム(CL-Xposure フィルム, Pierce 34075)に20分間オートラジオグラフした。結果を図6に示す(FP2: レーン1および2; AL2: レーン3および4; AL3: レーン5および6)。この実験に基づき、3つの結論が導き出される。第1に、部分および完全修飾オリゴは、ポリヌクレオチドキナーゼのような核酸特異酵素の基質として機能する能力において、天然核酸の優れた模倣

物である。第2に、LNA修飾オリゴは標準的な核酸を析出する際に通常採用される手順によって効率よく析出することができる。実際に、オートラジオグラムにおける非修飾オリゴ(レーン1,2)、部分修飾オリゴ(レーン3,4)、および完全修飾オリゴ(レーン5,6)の相対的なシグナル強度は、標準のDNAオリゴがLNAヌクレオシドを多く含むほど、標準のDNAオリゴがより効果的に塩/アルコール工程によって析出することができることを示唆している。第3に、オートラジオグラムにおける非修飾オリゴ、部分修飾オリゴおよび完全修飾オリゴのシグナル位置が近いことはLNAヌクレオシドのDNAオリゴへの組み込みがポリアクリルアミドゲル中の電気泳動運動性を変化させないことを示している。

### 【0675】

#### 実施例 138

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いたLNA含有オリゴヌクレオチドの3'-末端標識。

LNAモノマーを含むオリゴヌクレオチドを酵素のターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを用いて3'-末端標識した。配列およびLNA修飾の程度は次の通りである(LNAモノマーは太字):

### 【0676】

#### 【化22】

コントロール	5' GGT GGT TTG TTT G 3'
(1)	5' GGT GGT TTG TTT G 3'
(2)	5' GGT GGT TTG TTT G 3'
(3)	5' <b>GGT GGT TTG TTT G</b> 3'

### 【0677】

オリゴヌクレオチド(50 pmol)を、250  $\mu$ l の100mM カコジル酸塩緩衝液 pH 7.2, 2mM CoCl<sub>2</sub> および0.2mM 2-メルカプトエタノール中の100ユニットの250  $\mu$ Ci [ $\alpha^{-32}$ P]ddATP (3000 Ci/mmol)とターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼと37°Cで2時間インキュベートした。次いで反応をホルムアミドローディング緩衝液を加えて停止し、100°Cで5分間熱し、その後水上に置いた。試料(0

.2 pmol)を7M 尿素を含む19% アクリルアミドゲルに流し、オリゴヌクレオチドバンドへの放射活性の取り込み率をリンイメージャー (phosphorimager) (Molecular Dynamics)を用いて数値化した。この結果は全ての場合におけるLNA含有量が高いオリゴヌクレオチドを含む放射活性の取り込みを示す: コントロール 94.9 %, (1) 39.7%, (2) 83.7%, (3) 31.7%。LNA修飾オリゴはTdT酵素の基質であると断定する。

## 【0678】

## 実施例 139

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)のLNA修飾オリゴヌクレオチド末尾への能力はオリゴマーデザインに依存する。

次の15量体プライマーおよび8~32塩基オリゴヌクレオチドマーカー混合物を [ $\gamma^{33}P$ ] ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼで 5'末端標識した (LNAモノマーは太字):

## 【0679】

## 【化23】

P1 5'-TGC ATG TGC TGG AGA-3'  
 P2 5'- GC ATG TGC TGG AGA T-3'  
 PZ1 5'-TGC ATG TGC TGG AGA-3'  
 PZ2 5'- GC ATG TGC TGG AGA T-3'

## 【0680】

標識後、反応を5分間沸騰させ、すべてのPNK活性を除去した。4 pmoleの各標識プライマー、25 U ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼおよび16  $\mu M$  dATPを25  $\mu l$  の100 mM カコジル酸塩緩衝液pH 7.2, 2 mM CoCl<sub>2</sub> および0.2 mM 2-メルカプトエタノール中で37°Cで9分間インキュベートした。反応をホルムアミド停止液を加えることにより停止し、反応生成物を19%ポリアクリルアミド7 M尿素ゲルに標識マーカーと共に流した。Biomax フィルムを用いたオートラジオグラフィを乾燥ゲル上で行った。図22に示すように、P1 (レーン2), P2 (レーン 4) およびPZ1 (レーン 3)は8-32塩基標識に基づき、全て概算で70 塩基

以上の末尾 (tail) を得た(レーン1および6)。プライマーPZ2(レーン5)はこの反応条件では伸長しなかった。TdT酵素はオリゴヌクレオチド中のLNAモノマーに対して耐性であるが、最終の3'末端に対してはそうではないことがいえる。

### 【0681】

#### 実施例 140

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)の基質としてのLNA-チミジン-5'-トリホスフェート(LNA-TTP)。

ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)の基質として受容されるLNA-TTPのトリホスフェート(実施例123)の能力を試験するために、オリゴヌクレオチド末尾(tail)反応を行った。15量体プライマー(配列: 5'-TGC ATG TGC TCG AGA-3')および8~32塩基オリゴヌクレオチド標識の混合物を[ $\gamma^{33}$ ]ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端標識した。標識後、反応を5分間沸騰させてすべてのPNK活性を除去した。4pmoleの標識プライマー、25 Uターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼおよび32, 64または128  $\mu$ MのdTTPまたはLNA-TTPを25  $\mu$ lの100 mMカコジル酸塩緩衝液pH 7.2, 2 mM CoCl<sub>2</sub>および0.2 mM 2-メルカプトエタノール中で37°Cで90分間インキュベートした。反応をホルムアミド停止液を加えることにより停止し、反応性生物を19%ポリアクリルアミド7M尿素ゲルに標識マーカーと共に流した。Biomaxフィルムを用いたオートラジオグラフィを乾燥ゲル上で行った。図10に示すように、32  $\mu$ MのdTTP(レーンB), 64  $\mu$ MのdTTP(レーンC)または128  $\mu$ MのdTTP(レーンD)のいずれかを用いた反応は全て(一番左と右のレーン)、8~32オリゴヌクレオチド標識に基づくと100ヌクレオチド以上と推定される追跡オリゴヌクレオチドを生成した。LNA-TTP反応(32  $\mu$ MのdTTP(レーンE), 64  $\mu$ MのdTTP(レーンF)または128  $\mu$ MのdTTP(レーンG))は全て、1つの塩基で伸長したプライマーおよびそれ以上の塩基で伸長した~50%のプライマーを生じた。この結果はリボヌクレオチドおよびTdTにおいて得られた結果と酷似している。LNA誘導トリホスフェートはTdT酵素によって認識され、DNAオリゴヌクレオチドに組み込まれる。LNA-TTPがポリメラーゼに結合できるというこの後者の発見はヌクレオシド製剤としてLNAモノマー誘導体を使用することができる強調してい

る。

### 【0682】

#### 実施例 141

エキソヌクレアーゼのないクレノーフラグメントDNAポリメラーゼ IはLNAアデノシン、シトシン、グアノシンおよびウリジン-5'-トリホスフェート(LNA ATP, LNA CTP, LNA GTP, LNA UTP)をDNA鎖に組み込むことができる。

LNA NTP's(実施例123を参照)およびリボヌクレオチドをエキソヌクレアーゼのないクレノーフラグメントDNAポリメラーゼI(EFK)の基質として評価するためにプライマー伸長アッセイを使用した。 $^{33}\text{P}$  5'末端標識15量体プライマーを使用したアッセイは、4つの異なる24量体テンプレートのうちの1つにハイブリッドした。プライマーおよびテンプレートの配列は(LNAモノマーは太字):

### 【0683】

#### 【化24】

プライマー	5' TGCATGTGCTGGAGA 3'
テンプレート1	3' ACGTACACGACCTCTACCTTGCTA 5'
テンプレート2	3' ACGTACACGACCTCTCTTGATCAG 5'
テンプレート3	3' ACGTACACGACCTCTGGCTAGTC 5'
テンプレート4	3' ACGTACACGACCTCTGAAGTAGTC 5'

### 【0684】

1 pmoleの $^{33}\text{P}$ 標識プライマーをx2 クレノー 緩衝液中の2 pmoleのテンプレートにハイブリッドした。これに $4\mu\text{M}$  のdNTP $\alpha$ S または  $500\mu\text{M}$  のLNA NTPあるいは $4\mu\text{M}$  のdNTP $\alpha$ S と  $500\mu\text{M}$  のLNA NTPの混合物のいずれかを加えた。EFK DNAポリメラーゼの2ユニットを各反応に加えた。2mU 無機ピロホスファターゼを各反応に加えた。プライマーおよびテンプレートおよび酵素コントロールも同じく行った。全ての反応は全容量 $20\mu\text{l}$ で行った。反応を $37^\circ\text{C}$ で3分間インキュベートした。次いで反応を $10\mu\text{l}$  ホルムアミドEDTA停止液を加えて停止した。反応性生物を19% ポリアクリルアミド7M尿素ゲルで分離し、Kodak Biomax オートラジオグラフィフィルムに露出した後、生成物の画分を $^{33}\text{P}$  標識8-32塩基オリゴヌクレ

オチドラダー (ladder) と比較しながら大きさで分離した。

### 【0685】

図20にテンプレート1を用いたLNA-UTPの結果を示す。トラック(1-12)は以下の反応に対応する: EFKによるLNA UTPの組み込み。レーン1 - プライマー、テンプレートおよび酵素。レーン2 - プラス dTTP $\alpha$ S。レーン3 - プラス LNA UTP。レーン4 - プラス dTTP $\alpha$ S および dGTP $\alpha$ S。レーン5 - プラス LNA UTP および dGTP $\alpha$ S。レーン6 - プラス dATP $\alpha$ S, dGTP $\alpha$ S および dTTP $\alpha$ S。レーン7 - プラス LNA UTP, dCTP $\alpha$ S, dGTP $\alpha$ S および dTTP $\alpha$ S。レーン8 - プラス dGTP $\alpha$ S。レーン9 - プラス dCTP $\alpha$ S, dGTP $\alpha$ S および dTTP $\alpha$ S。レーン10 - プラス LNA UTP, dATP $\alpha$ S, dCTP $\alpha$ S および dGTP $\alpha$ S。レーン11 - プラス dATP $\alpha$ S, dCTP $\alpha$ S および dGTP $\alpha$ S。レーン12 - 全4つのdNTP $\alpha$ S全て。どちらのレーンも生成物を大きさ分類するために使用した8 - 32塩基オリゴヌクレオチド標識を示す。

### 【0686】

図20から明らかなように、LNA UTP は特に "T" として組み込まれる。dNTP $\alpha$ SでのLNA UTP 終結 3'末端からのさらなる伸長は非常に緩慢である。

### 【0687】

図21にテンプレート2-4を使用したLNA-ATP, LNA CTPおよび LNA GTPの結果を示す。トラック(1-21)は以下の反応に対応する: レーン1, 7, 13 および 17 - プライマー、テンプレートおよび酵素。レーン2 - プラス dGTP $\alpha$ S。レーン3 - プラス dATP $\alpha$ S および dGTP $\alpha$ S。レーン4 - プラス LNA GTP。レーン5 - プラス dGTP $\alpha$ S および LNA ATP。レーン6 - プラス LNA ATP および LNA GTP。レーン8 - プラス dATP $\alpha$ S。レーン9 - プラス dATP $\alpha$ S および dCTP $\alpha$ S。レーン10 - プラス LNA ATP。レーン11 - プラス dCTP $\alpha$ S および LNA ATP。レーン12 - プラス dATP $\alpha$ S および LNA CTP。レーン14 - プラス dTTP $\alpha$ S。レーン15 - プラス dGTP $\alpha$ S および dTTP $\alpha$ S。レーン16 - プラス dTTP $\alpha$ S および LNA GTP。レーン18 - プラス dCTP $\alpha$ S。レーン19 - プラス dCTP $\alpha$ S および dTTP $\alpha$ S。レーン20 - プラス LNA CTP。レーン21 - dTTP $\alpha$ S および LNA CTP。どちらのレーンも生成物を大きさ分類するために使用した8 - 32塩基オリゴヌクレ

オチド標識を示す。

### 【0688】

テンプレート2を用いた実験(トラック1-6)により、LNA GTPがプライマーを効果的に伸長して(トラック4)+1生成物を生成することができる。dGTP <sub>$\alpha$</sub> SおよびLNA ATPを加えることにより、主に+2生成物(トラック5)が生じる。これはdGTP <sub>$\alpha$</sub> Sを取り込むことによって+1生成物を得、次いでLNA ATPでの伸長が生じることによる。LNA ATPを連続して取り込むことから少量の+3生成物の徵候がある。テンプレート3を使用した実験(トラック7-12)により、LNA ATPが効果的に取り込まれて+1生成物が生じたことがわかる(トラック10)。この生成物のdCTP <sub>$\alpha$</sub> Sでの伸長は緩慢である(トラック11)。dATP <sub>$\alpha$</sub> SおよびLNA CTPを加えることにより、+2および+3生成物が生じる(トラック12)。示唆的な+1生成物が存在しないことにより、最初のLNA CTPの添加が効果的であり、2回目のLNA CTPの添加が緩慢であることがわかる。テンプレート1(トラック13-16)および4(トラック17-21)を用いた実験結果から、他のテンプレートにおける結果の同様の傾向がわかる。LNA CTPは効果的に取り込まれてテンプレート4で+1生成物を生じさせる(トラック20)。この生成物のdTTP <sub>$\alpha$</sub> Sによる伸長はまた緩慢である(トラック21)。LNA GTPおよびdTTP <sub>$\alpha$</sub> Sをテンプレート1の反応に加えることにより、+2生成物が生じる(トラック16)。これはまた、一回のLNAトリホスフェートの添加は効果的であるが、連続的なLNAトリホスフェートの添加は緩慢であることを示す。

### 【0689】

実施例 142

LNAモノマーはエキソヌクレアーゼIIIによる消化に対するオリゴヌクレオチドの耐性を向上するのに使用することができる。

オリゴヌクレオチドを含むLNAのエキソヌクレアーゼIII分解への耐性を試験するため、以下の反応を行った。以下の15量体プライマーおよび8-32塩基オリゴヌクレオチドマーカーを[ $\gamma^{33}$ P]ATPおよびT4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端標識した(LNAモノマーは太字):

### 【0690】

## 【化25】

P2 5'- GC ATG TGC TGG AGA T-3'  
 PZ2 5'- GC ATG TGC TGG AGA T-3'

## 【0691】

標識後、反応を5分間沸騰させてすべてのPNK活性を除去した。8 pmoleの各プライマーを25 pmoleテンプレート(配列: 3'- ACG TAC ACG ACC TCT ACC TTG CTA-5')に×2 クレノー緩衝液中でハイブリッドした。10ユニットのエキソヌクレアーゼIIIを各反応に加えた。コントロールは酵素の代わりに $1\mu\text{l}$ の水を加えて設定した。反応を37°Cで5分間インキュベートした。反応を $10\mu\text{l}$  ホルムアミド/EDTA停止液を加えて停止した。反応を19%ポリアクリルアミド7M尿素ゲルに入る前に95°Cで3分間熱した。ゲルを3MMの紙に移して乾燥する前に10%酢酸/10%メタノール中で固定した。乾燥したゲルを3時間蛍光体スクリーンに暴露した。蛍光体スクリーンをイメージクアント (ImageQuant) ソフトウェアを用いて分子力学ストーム (Molecular Dynamics Storm) 860装置で分析した。蛍光体スクリーン分析により、酵素の非存在下ではP2全長帯(full length band)はシグナル中99%、PZ2全長帯はシグナル中96%であった。酵素の存在下では、5分間のインキュベート後、20%のP2全長生成物のみが残留した。しかしながら同処理後、62%の全長PZ2生成物が残留していた。これはオリゴヌクレオチドの3'末端の一個のLNAモノマーがエキソヌクレアーゼIIIによる分解に対する耐性を増強させることができる事を示している。

## 【0692】

PCRの応用

実施例 143

LNAモノマーはビオチン化-DNAオリゴの性能を、MTPフォーマットでのPCRアンプリコンの配列特異的捕捉において、顕著に増加させるために使用することができる。pUC19からの2つのDIG標識アンプリコンをPCR增幅により以下のように生成した:

## 【0693】

## アンプリコン 1のPCR 反応混合物

$1\mu\text{l}$  pUC19 (1 ng/ $\mu\text{l}$ ) ,  
 $1\mu\text{l}$  逆プライマー (5'-AACAGCTATGACCATG-3') ( $20\mu\text{M}$ ) ,  
 $1\mu\text{l}$  前進 (forward) プライマー (5'- GTAAAACGACGGCCACT-3') ( $20\mu\text{M}$ ) ,  
 $10\mu\text{l}$  dUTP-mix (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP および 6mM dUTP) ,  
 $1.5\mu\text{l}$  DIG-11-dUTP (1 mM)  
 $10\mu\text{l}$  10x Taq緩衝液(ベーリンガー・マンハイム 含MgCl<sub>2</sub>)  
 $1\mu\text{l}$  Taqポリメラーゼ(ベーリンガー・マンハイム) 5 U/ $\mu\text{l}$   
H<sub>2</sub>O まで  $100\mu\text{l}$

## 【0694】

## アンプリコン 2のPCR 反応混合物

$1\mu\text{l}$  pUC19 (1 ng/ $\mu\text{l}$ ) ,  
 $0.4\mu\text{l}$  プライマー-3 (5'-GATAAGTGCCTCACTGAT-3') ( $50\mu\text{M}$ ) ,  
 $0.4\mu\text{l}$  プライマー-4 (5'-GTCGTTGGCTCCAAGCTG-3') ( $50\mu\text{M}$ ) ,  
 $10\mu\text{l}$  dUTP-mix (2 mM dATP, 2 mM dCTP, 2 mM dGTP および 6mM dUTP) ,  
 $1.5\mu\text{l}$  DIG-11-dUTP (1 mM)  
 $10\mu\text{l}$  10x Taq緩衝液 (ベーリンガー・マンハイム 含MgCl<sub>2</sub>)  
 $1\mu\text{l}$  Taqポリメラーゼ (ベーリンガー・マンハイム) 5 U/ $\mu\text{l}$   
H<sub>2</sub>O まで  $100\mu\text{l}$

## 【0695】

PCR反応: (サイクラー: パーキン・エルマー 9600) 94°C、5分間; ポリメラーゼ添加; 94°C 1分間, 45°C 1分間、70°C 2分間 (29 サイクル)、72°C 10分間。

## 【0696】

各PCR反応から  $10\mu\text{l}$  を標準アガロースゲルで分析したところ、約100 bpおよび500 bpの予想画分が見られた。

## 【0697】

$10\mu\text{l}$  のDIG-標識アンプリコン 1またはアンプリコン 2を1xSSC (0.15 M NaCl, 15mM クエン酸, pH 7.0) 中で 5 pmol の 5' ビオチン化捕捉プローブと全容量 450  $\mu\text{l}$  で混合した。以下の捕捉プローブを使用した:

【0698】

【化26】

B-DNA1(ビオチン-ATGCCTGCAGGTCGAC-3'; アンプリコン1に特異的なDNAプローブ), B-DNA2(ビオチン-GGTGGTTTGTGG-3'; アンプリコン2に特異的なDNAプローブ)およびB-LNA2(ビオチン-**GGTGGTTGTGG-3'**, 太字はLNA又クレオシド; アンプリコン2に特異的なLNAプローブ)。

【0699】

アンプリコンを変性するために反応を95°Cで5分間熱し、25°Cで15分間冷却し、プローブと標的アンプリコン鎖とのハイブリッドを促進した。ハイブリッド後、190 μlの各反応をストレプタビジンを塗布したマイクロプレート(Pierce, cat. no.15124)に移し、37°Cで1時間インキュベートした。プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBST, 0.15 M Na<sup>+</sup>, pH 7.2, 0.05% Tween 20, 3x 300 μl)で洗浄した後、200 μlのペルオキシダーゼ標識抗-DIG抗体を加えた(ベーリンガー・マンハイム, PBST中で1:1000に希釈)。プレートを37°Cで30分インキュベートし、洗浄した(PBST, 3x 300 μl)。100 μlの基質溶液(0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 pH 5.0, 0.66mg/ml オルトフェニレンジアミンジヒドロクロリド、0.012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を加えることにより、ウェルをペルオキシダーゼ活性についてアッセイした。反応を8分後に100 μl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.5 M)を加えて停止し、492 nmでの吸収度をマイクロプレートリーダーで読みとった。図3に示すように、非修飾ビオ-DNA捕捉プローブ(B-DNA1およびB-DNA2)は両方とも予想した通りに機能した。つまりこれらはそれぞれの標的PCRアンプリコンのみを捕捉した。B-DNA1プローブと比較して、B-DNA2プローブは同じ性質のアンプリコンの捕捉にはそれほど効果的ではなかった。しかしながらB-DNA2プローブの捕捉効率は13のDNA又クレオシドのうち12を対応するLNA又クレオシドと置換したことにより劇的に向上した。図3に示すように、B-DNA2プローブの代わりにB-LNA2プローブを使用すると、アッセイの感度が10倍以上になる。B-LNA2は、関連および非関連アンプリコンを効果的に区別する非修飾B-DNA2の能力を維持すると同時に、LNAオリゴの優れた特異性を強化する。  
1)LNA修飾オリゴに共有結合的に付着したビオチンはストレプタビジンと結合

する能力を保持すること、2)LNA修飾オリゴはMTP ベース アンプリコン捕捉アッセイにおいて効果的に機能すること、および3)LNAはPCR アンプリコンの親和的捕捉における標準DNAオリゴの性能を劇的に向上させる手段を提供することが断定される。

## 【0700】

## 実施例 144

LNA置換オリゴは同性質のPCR アンプリコンを鎖侵入によって捕捉することができる。2組の独立したアンプリコン 1または2の $10 \mu\text{l}$  反応物(実施例143と同様に生成)を、全容量 $450 \mu\text{l}$ の、 $1 \times \text{SSC}$  ( $0.15 \text{ M NaCl}$ ,  $15\text{mM}$  クエン酸塩, pH 7.0)中、1, 5または $25\text{pmol}$ のB-LNA2捕捉プローブ

## 【0701】

## 【化27】

(ビオチン-**GGTGGTTTGTTG-3'**, LNA ヌクレオシドは太字; アンプリコン 2 に特異なプローブ)

## 【0702】

のいずれかと混合した。1組の反応物を $95^\circ\text{C}$ で5分間熱して、アンプリコンを変性し、 $25^\circ\text{C}$ に冷却してプローブと標的アンプリコン鎖とのハイブリッドを促進した。別の組の反応物は変性させないままにした。それぞれの反応物から $190 \mu\text{l}$ をトレプタビジンを塗布したマイクロプレート(Pierce, cat. no.15124)に移し、 $37^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートした。プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBST,  $0.15 \text{ M Na}^+$ , pH 7.2, 0.05% Tween 20,  $3 \times 300 \mu\text{l}$ )で洗浄した後、 $200 \mu\text{l}$ のペルオキシダーゼ標識抗-DIG抗体を加えた(Boehringer Manheim, PBST中で1:1000に希釈)。プレートを $37^\circ\text{C}$ で30分間インキュベートし、洗浄した(PBST,  $3 \times 300 \mu\text{l}$ )。 $100 \mu\text{l}$ の基質溶液( $0.1 \text{ M}$  クエン酸-リン酸緩衝液 pH 5.0,  $0.66\text{mg/ml}$  オルトフェニレンジアミン 2 塩酸塩、 $0.012\% \text{ H}_2\text{O}_2$ )を加えることにより、ウェルをペルオキシダーゼ活性についてアッセイした。10分後、 $100 \mu\text{l}$ の $\text{H}_2\text{SO}_4$  ( $0.5 \text{ M}$ )を加えて反応を停止し、 $492 \text{ nm}$ での吸収度をマイクロプレートリーダーで読み取った。アンプリコンがハイブリッド前に捕捉プローブ(図4A)で変性されていると

きは、実施例143と同様の効果的な配列特異的アンプリコンの捕捉が見られる。B-LNA2濃度を1から5pmolに増加すると捕捉親和性が増加する。プローブを25pmolにさらに増加させると、シグナルが減少する。これはストレプタビジンMTPにおける使用可能なビオチン結合部位が飽和状態であることと一致する。アンプリコンがハイブリッド前に捕捉プローブで変性されていないとき(図4B)においても、効果的な配列特異的アンプリコンの捕捉が確認される。実際、このデータから、変性していないアンプリコン捕捉は変性したアンプリコン捕捉と同様、効果的かつ特異的であることがわかる。これはビオ-LNA2プローブが標的配列を鎖侵入によって結合することができることを強力に示している。我々の知る限りでは、これは生理的食塩条件下で混合プリン/ピリミジンプローブによってdsDNAの配列特異的ターゲティングを行った最初の例である。基本的研究およびDNA診断手順の範囲を著しく簡素にできる可能性は別として、このLNA修飾オリゴの予期し得なかった特性には、アンチセンスによる効果的な新薬の開発および特に抗遺伝子の研究方法における主な重要性を予見することができる。

## 【0703】

## 実施例 145

PCR アンプリコンの配列特異的捕捉において固形表面上に効果的に固定されたLNA置換オリゴ。

ストレプタビジンを塗布したマイクロタイタープレート(ベーリングガー・マンハイム)のウェルを全容量 $100\mu\text{l}$ の1×SSC (0.15 M NaCl, 15mM クエン酸, pH 7.0)中の5 pmolのB-DNA2プローブ(ビオチン-GGTGGTTTGTGG-3'; アンプリコン 2に特異なDNAプローブ)または B-LNA2プローブ

## 【0704】

## 【化28】

(ビオチン-GGTGGTTTGTGG-3', LNA ヌクレオシドは太字; アンプリコン 2に特異な LNA プローブ)

## 【0705】

のいずれかと1時間インキュベートした。全部で4つのウェルを B-DNA2プローブ

とインキュベートし、4つのウェルをB-DNA2プローブとインキュベートし、4つのウェルを緩衝液のみでインキュベートした。インキュベートした後、ウェルを1×SSCで3回洗浄した。DIG-標識アンプリコン1(60 $\mu$ l)またはアンプリコン2(60 $\mu$ l)(実施例143と同様に生成)を540 $\mu$ lの1×SSCと混合し、95℃で5分間熱変性し、マイクロプレートウェルに移した(100 $\mu$ l)。B-DNA2、B-LNA2のいずれかを含むかまたは捕捉プローブを含まない2つのウェルにアンプリコン1を収容し、B-DNA2、B-LNA2を含むかまたは捕捉プローブを含まない2つのウェルにアンプリコン2を収容した。37℃で1時間後、プレートをリン酸緩衝生理食塩水(PBST, 0.15 M Na<sup>+</sup>, pH 7.2, 0.05% Tween 20, 3×300 $\mu$ l)で3回洗浄し、200 $\mu$ lのペルオキシダーゼ標識抗-DIG抗体を加えた(ベーリンガー・マンハイム, PBST中で1:1000に希釈)。プレートを37℃で30分間インキュベートし、300 $\mu$ lのPBSTで3回洗浄した。100 $\mu$ lの基質溶液(0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液pH 5.0, 0.66 mg/ml オルト-フェニレンジアミン2塩酸塩, 0.012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を加えることによりウェルをペルオキシダーゼ活性についてアッセイした。反応を6分後に100 $\mu$ lのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(0.5 M)を加えて停止し、492 nmでの吸収度をマイクロプレートリーダーで読み取った。図5に示すように、LNA修飾捕捉プローブ(B-LNA2)はその特異的アンプリコン(アンプリコン2)を対応する非修飾DNA捕捉プローブ(B-DNA2)よりもさらに効果的に捕捉する(感度は約5倍の増加)。B-LNA2プローブを非関連アンプリコン(アンプリコン1)とインキュベートしたときはどのようなシグナルも得られなかった。これはB-LNA2プローブの優れた特異性を強調する。LNA修飾オリゴは固体面に固定されたときにPCRアンプリコンの配列特異的捕捉において効果的に機能することが結論付けられる。さらに、LNA修飾オリゴを標準DNAオリゴの代わりに使用することにより、ノイズ比により良いシグナルが提供されることが断定できる。したがって、LNAは、例えば複数の固定プローブを使用して試料中の異なる標的配列の存在を同時に検出するアレイフォーマット(array format)のような固定された捕捉プローブを使用する現在のDNAに基づくアッセイの性能を有意に向上するための手段を提供する。

【0706】

実施例 146

完全に混合したLNAモノマーはMTPフォーマットにおけるPCRアンプリコンの配列特異的捕捉において固定したビオチン化-DNAオリゴの性能を有意に増加するために使用することができる。

Nras配列からの3つのDIG標識アンプリコン(参照: Nucleic Acid Research, 1985, Vol. 13, No. 14, p 52-55)をPCR増幅により次のように生成した:

PCRプライマー:

前進プライマー: NAR レファレンスによる 5'-CCAGCTCTCACTAGTTAGTACA-3' 塩基 701-723。

910 bp 逆プライマー: 5'-GTAGAGCTTCTGGTATGACACA-3' 塩基 1612-1590 (NAR レファレンスによる逆配列)。

600 bp 逆プライマー: 5'-TAAGTCACAGACGTATCTCAGAC-3' 塩基 1331-1308 (NAR レファレンスによる逆配列)。

200 bp 逆プライマー: 5'-CTCTGTTCAAGACATGAAC TGCT-3' 塩基 909-886 (NAR レファレンスによる逆配列)。

#### 【0707】

Nras アンプリコンのPCR反応混合物: 2.3 $\mu$ l ヒト胎盤ゲノムDNA (440 ng/ $\mu$ l), 50 $\mu$ l 10x PCR緩衝液 ( $MgCl_2$  を含まない、パーキン・エルマー), 30 $\mu$ l 25 mM M $gCl_2$ , 50 $\mu$ l dNTP-mix (2 mM dATP, dCTP, dGTP および 1.8 mM dTTP), 10 $\mu$ l の 1 mM Dig-11-dUTP, 10 $\mu$ l の 25 $\mu$ M 前進プライマー, 10 $\mu$ l の 25 $\mu$ M 逆プライマー, 5 $\mu$ l の 5 U/ $\mu$ l AmpliTaq Gold (パーキン・エルマー) および水を 500 $\mu$ l まで。

#### 【0708】

PCR反応: 上記混合物はすべて Nras PCR 生成物から形成した。違いは逆プライマー - 910 bp, 600 bp または 200 bp が一回で加えられたことだけである。PCR混合物は10個のPCRチューブにそれぞれアリコートし、パーキン・エルマー 9600 で以下の条件で循環させた: 95°C 3分間; 55°C 2分間, 72°C 3分間, 95°C 1分間(30サイクル); 55°C 2分間, 72°C 10分間および 4°C で浸漬。各PCR反応物から 10 $\mu$ l をそれぞれ標準アガロースゲルで分析し、約 910 bp, 600 bp および 200 bp の予想画分を確認した。

#### 【0709】

アッセイ条件：ストレプタビジンを塗布したマイクロタイタープレートのウェル（ベーリンガー・マンハイム；ウェルあたり 20 pmol ビオチン結合能力）を、5 × SSCT (0.75 M NaCl, 75 mM クエン酸, pH 7.0, 0.1% Tween 20) 中で、

## 【0710】

## 【化29】

1 pmol の DNA Nras Cap A (ビオチン-5'-TTCCACAGCACAA-3'), LNA/DNA Nras Cap A (ビオチン-5'-TTCCACAGCACAA-3'), LNA Nras Cap A (ビオチン-5'-TTCCACAGCACAA-3'), DNA Nras Cap B (ビオチン-5'-AGAGCCGATAACA-3'), LNA/DNA Nras Cap B (ビオチン-5'-AGAGCCGATAACA-3') または LNA Nras Cap B (ビオチン-5'-AGAGCCGATAACA-3')

## 【0711】

のいずれかとともに 37°C で 1 時間インキュベートした；LNA ヌクレオシドは太字。Nras Cap A 捕捉プローブはアンプリコン Nras 910, Nras 600 および Nras 200 を捕捉した。Nras Cap B 捕捉プローブは特異的アンプリコン Nras 910 および Nras 600 を捕捉した。異なる捕捉プローブとインキュベートした後、ウェルを 5 × SSCT 中で洗浄し、95 μl の 1 × SSCT (0.15 M NaCl, 15 mM クエン酸, pH 7.0, 0.1% Tween 20) 中の 5 μl の天然または変性 (95°C 5 分間および氷上で 10 分間) DIG 標識アンプリコン (Nras 910, Nras 600 または Nras 200) をウェル毎に加え、37°C で 1 時間インキュベートした。ウェルをリン酸緩衝生理食塩水 (1 × PBST, 0.15 M Na<sup>+</sup>, pH 7.2, 0.05% Tween 20) で 3 回洗浄し、200 μl ペルオキシダーゼ 標識抗-DIG 抗体 (ベーリンガー・マンハイム, 1 × PBST 中で 1:1000 に希釈) と共に 37°C で 30 分間インキュベートした。最後にウェルを 1 × PBST 中で 3 回洗浄し、100 μl の基質溶液 (0.1 M クエン酸-リン酸緩衝液 pH 5.0, 0.66 mg/ml オルト-フェニレンジアミン 2 塩酸塩, 0.012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を加えることにより、ペルオキシダーゼ活性についてアッセイした。9 分後、100 μl の 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて反応を停止し、492 nm での吸収度をマイクロタイタープレートリーダーで読み取る前に H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で 4 倍希釈した。図 23A に示すように、12 個の LNA ヌクレオシドでスパイクされた捕捉プローブ (LNA Nras Cap A および LNA Cap B) は前もって変性していない

い特異的なアンプリコン(天然のアンプリコン)を非常に効果的に捕捉した。4個のLNAヌクレオシドでスパイクされた捕捉プローブ(LNA/DNA Nras Cap A および LNA/DNA Nras Cap B)はそれほど効果的ではなく、同じアンプリコンを捕捉し、DNA捕捉プローブ(DNA Nras Cap A および DNA Nras Cap B)は特異なアンプリコンをまったく捕捉しなかった。対照のアンプリコンであるNras 200はLNA Cap B または LNA/DNA Nras Cap Bプローブのどちらにも捕捉されず、LNAでスパイクした捕捉プローブの優れた特異性を証明している。図23Bに変性したアンプリコンについて行った同様の実験を示す。本質的に、捕捉効率が概して向上したという本質的な違いをもって同一の情況が現れる。混合LNAヌクレオシド(A, T, C または C LNA ヌクレオシド)を含むLNA修飾オリゴは固体表面に固定されたときのPCRアンプリコンの配列特異的捕捉において効果的に機能するといえる。LNAは前もって変性しないアンプリコンの捕捉、つまり鎖置換による捕捉において効果的に機能する捕捉プローブを構成する手段を提供するといえる。この能力はDNAに基づく現在のアンプリコン検出フォーマットを有意に簡略化することを容易にする。

## 【0712】

実施例 147

LNA修飾オリゴは核酸ポリメラーゼのプライマーとして機能する。

## 【0713】

## 【化30】

LNA 修飾オリゴ (5'-GGTGGTTTGTGG-3', LNA ヌクレオシドは太字)

## 【0714】

のテンプレートに依存するプライマーおよび酵素的伸長として機能する能力を3つの異なるクラスのポリメラーゼを用いて調査した。RNA および DNAの両方をテンプレートとして使用することができる逆転写酵素M-MuLV (ベーリングガー・マンハイム)、標準 DNA ポリメラーゼおよび熱安定ポリメラーゼに対応するクレノーポリメラーゼ、 BM-TAQ (ベーリングガー・マンハイム)。対照として、伸長反応を同一の非修飾DNAプライマー (5'-GGTGGTTTGTGG-3')を用いて行った。LNAおよびD

NAプライマーを $^{32}\text{P}-\gamma$ -ATPで実施例137に記載のように標識した。50量体 DNAオリゴ(5'-AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAAAAGCATCTCACAAACAAACACC-3')をテンプレートとして使用した。**M-MuLV**(ベーリンガー・マンハイム,)との反応は $2\mu\text{l}$ の標識LNA-プライマーまたはDNAプライマー( $10\mu\text{M}$ )のいずれか、 $2\mu\text{l}$ のDNAテンプレート( $10\mu\text{M}$ )、 $2\mu\text{l}$ の2mM dNTP、 $2\mu\text{l}$ の $10\times$ 緩衝液(500mM Tris-HCl, 300mM KCl, 60mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT, pH 8.3 (37°C))、 $1\mu\text{l}$ の酵素( $20\text{U}/\mu\text{l}$ )および水を $20\mu\text{l}$ まで含んでいた。反応を37°Cで60分間インキュベートした。クレノーポリメラーゼ(USB)との反応は $2\mu\text{l}$ の標識LNA-またはDNAプライマー( $10\mu\text{M}$ )のいずれか、 $2\mu\text{l}$ のDNAテンプレート( $10\mu\text{M}$ )、 $2\mu\text{l}$ の2mM dNTP、 $2\mu\text{l}$ の $10\times$ 緩衝液(100mM Tris-HCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 75mM DTT, pH 7.5)、 $1\mu\text{l}$ の酵素( $10\text{U}/\mu\text{l}$ )および水を $20\mu\text{l}$ まで含んでいた。これら反応を37°Cで60分間インキュベートした。**B-Taq**(ベーリンガー・マンハイム)との反応は $2\mu\text{l}$ の標識LNA-またはDNAプライマー( $10\mu\text{M}$ )のいずれか、 $2\mu\text{l}$ のDNAテンプレート( $10\mu\text{M}$ )、 $2\mu\text{l}$ の2mM dNTP、 $2\mu\text{l}$ の $10\times$ 緩衝液(100mM Tris-HCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KCL, pH 8.3)、 $1\mu\text{l}$ の酵素( $5\text{U}/\mu\text{l}$ )および水を $20\mu\text{l}$ まで含んでいた。反応を出発温度37°Cから1°C/分で60°Cまで勾配しながらインキュベートし、30分間維持した。インキュベート終了期に $10\mu\text{l}$ のローディング緩衝液(0.25% (w/v) プロモフェノールブルー、0.25% (w/v) キシレンシアノール、80% (v/v) ホルムアミド)を加え、反応を停止した。試料を95°Cで1分間熱し、氷上に置き、 $2\mu\text{l}$ を8%配列ポリアクリルアミドゲルに入れ、(Life Technologies Inc.) BRL モデル 52で電気泳動させた。電気泳動後、ゲルをガラスプレート上で乾燥し、オートラジオグラフィ(X線フィルム: Kodak X-Omat AR)に付した。図7に示すように、クレノーポリメラーゼ(レーン3)またはBTaqポリメラーゼ(レーン5)を使用するときは、LNAおよびDNAプライマーの両方において透明で類似した伸長生成物が確認された。**M-MuLV**逆転移酵素を使用するとき(レーン2)、伸長生成物はLNA-プライマーの場合にのみ検出することができる。酵素的伸長に付さなかった標識LNAおよびDNAプライマーはレーン1、4および6に存在する。LNA又クレオシドを標準DNAオリゴに組み込むことは、核酸ポリメラーゼによるオリゴ/テンプレート二重らせんの認識を妨害しないことがいえる。また、LNA修飾オリゴは非修飾DNAオリゴとしてのプライマーと

して効果的に機能するといえる。

### 【0715】

#### 実施例 148

LNA修飾オリゴは標的増幅工程においてプライマーとして機能する。

PCR増幅においてプライマーとして機能するLNA修飾オリゴの能力を、含有するLNAヌクレオシド数のみが異なる3つのオリゴ：

### 【化31】

**4 LNA ヌクレオシド (AL2 プライマー: 5'-GGTGGTTTGTGG-3', LNA ヌクレオシドは太字), 1 LNA ヌクレオシド (AL10 プライマー: 5'-GGTGGTTTGTGG-3', LNA ヌクレオシドは太字) および LNA ヌクレオシドなし (FP2 プライマー: 5'-GGTGGTTTGTGG-3').**

### 【0716】

を用いて分析した。PCR反応(100 $\mu$ l)は、テンプレートなし(対照), 0.01ng, 0.1ng または 1ngのテンプレート(pUC19プラスミド)のいずれか、0.2 $\mu$ M 逆プライマー (5'-GTGGTTCCCTCCAAGCTG-3')、0.2 $\mu$ MのAL2, AL10またはFP2前進プライマーのいずれか、200 $\mu$ MのdATP, dGTP, dCTPおよびdTTP、10mM Tris-HCl pH 8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM KClおよび2.5UのBM-Taqポリメラーゼを含んでいた。テクノジニアスサーモサイクラー (Techne Genius thermocycler) で、それぞれ94°C 1分間、 -45°C 1分間、 -72°C 1.5分間で合計50サイクルで行った(最初の30サイクル後さらに2.5UのTaqポリメラーゼを加えた)最終サイクル後、反応を72°Cで3分間、次いで4°Cで一晩インキュベートした。30 $\mu$ lの各反応に6 $\mu$ lのローディング緩衝液(0.25% (w/v) プロモフェノールブルーおよび40% (v/v) グリコール)を加え、試料を(Amplisize (商標) サイズマーカーと)2%アガロースゲルに入れ、150Vで45分間電気泳動させた。最後に、ゲルをエチジウムブロミドで染色して撮影した。図8に示すように、非修飾前進プライマーFP2および非修飾逆プライマーを用いたPCR反応は、使用したテンプレートの全量で正確な大きさの検出可能なアンプリコンを生じさせた(レーン9: 0.01ng テンプレート、レーン10: 0.1ng、レーン11: 1ng)。テンプレートなしのコントロール反応からはどのようなシ

グナルも得られなかった(レーン12)。FP2前進プライマーが1 中心LNAヌクレオシドを含むプライマー(AL10)で置換されているときも、アンプリコンは使用したテンプレートの全量で検出された(レーン5: 0.01ng、レーン6: 0.1ng、レーン7: 1 ng)。このことはAL10プライマーが指数関数的增幅を維持すること、つまりAL10プライマーがそのままの状態で伸長し、テンプレートとして使用されることを明白に示している。また、テンプレートなしのコントロール反応(レーン8)ではアンプリコンは生成されない。FP2前進プライマーが4中枢LNA ヌクレオシドを含むプライマー(AL2)で置換されているとき、正確な大きさのアンプリコンはどの反応においても検出できない(レーン1: 0.01ngテンプレート、レーン2: 0.1ng、レーン3: 1ng、レーン4: テンプレートなし)。しかしながらテンプレート濃度が最大(1ng)のときは、ゲル中に高い分子量帯が見られる(レーン3)。しかしながらテンプレートの最大量(1ng)のテンプレートでアンプリコンを生成する能力についてプライマーAL2(レーンA)、AL10(レーンB)、FP2(レーンC)およびRP1(レーンD)をそれぞれ試験したコントロール反応において指摘したように、これはRP1プライマーの人工物である。AL2が実施例147においてプライマーとして機能すると示されたため、検出可能なアンプリコンが存在しないことはテンプレートとして機能する能力が欠落している、つまり4つの連続したLNAヌクレオシドブロックがポリメラーゼの前進を阻害しており、反応を線増幅させている(この生成物は使用した実験構成では検出できない)ことを強力に示している。LNA修飾オリゴはPCR増幅においてプライマーとして使用することができるといえる。さらに、増幅の程度(完全に可能なものから線状の増幅を等級付けて)はLNA修飾オリゴのデザインによって制御可能であることがいえる。LNAヌクレオシドをプライマーに組み込むことによってポリメラーゼの前進をブロックする可能性が单一の鎖末端を有するアンプリコンの生成を容易にすることがいえる。このような末端は変性されることなく容易にハイブリッドされやすく、この特徴がさまざまの応用方法において有用である。

### 【0717】

実施例 149

5'アントラキノンを有するLNA修飾オリゴマーは照射により固形支持体に共有結

合的に固定され、固定されたオリゴマーは相補的DNAオリゴの捕捉に効果的である。

25 pmol/ $\mu$ lまたは12.5 pmol/ $\mu$ lのいずれかのアントラキノンDNAオリゴ(5'-AQ-CAG CAG TCG ACA GAG-3')またはアントラキノンLNA修飾DNAオリゴ(5'-AQ-CAG CAG TCG ACA GAG-3'; LNAモノマーには下線を付す)をポリカーボネートスライド(Nunc)上で0.2 M LiCl中でスポットした(1  $\mu$ l/スポット)。オリゴを穏やかなUV線で15分間照射した。照射後、スライドをミルQウォーター(Milli-Q water)で3回洗浄し、空気乾燥した。25mlの0.5 pmol/ $\mu$ lの相補的ビオチン化オリゴマー(5'-ビオチン-CTC TGT CGA CTG CTG-3')を5 × SSCT(75 mM クエン酸, 0.75 M NaCl, pH 7.0, 0.1% Tween 20)中で固定オリゴマーと50°Cで2時間ハイブリッドした。1 × SSCTで4回、リン酸緩衝生理食塩水(PBST, 0.15 M Na<sup>+</sup>, pH 7.2, 0.05% Tween 20)で1回洗浄した後、0.06  $\mu$ g/mlのストレプタビジン共役ホースラディッシュペルオキシダーゼおよび1  $\mu$ g/mlのストレプタビジンを含む25ml PBSTをスライドに加えた。スライドを30分間インキュベートし、25ml PBSTで4回洗浄した。製造業者の記載のとおりにスライドを化学発光基質(SuperSignal; Pierce)およびX線フィルム(CL-Xposureフィルム、Pierce 34075)で視覚化した。図9に示すように、AQ-DNAオリゴおよびAQ-LNA修飾DNAオリゴの両方において、明確に検出可能なシグナルを得た。アントラキノン結合LNA修飾DNAオリゴは照射により固体表面に効果的に付着し、このように付着したオリゴは相補的な標的DNAオリゴにハイブリッドすることができるといえる。

### 【0718】

#### 実施例 150

異なるLNA修飾Cy3-標識8量体との末端ミスマッチのアレイ上でのハイブリッド化および検出。

スライド標本：ガラススライドをアセトン中のアミノプロピルトリエトキシシリラン10%溶液でアミノシラン化し、アセトン中で洗浄した。以下のオリゴヌクレオチドをスライドにスポットした：

### 【0719】

#### 【表11】

使用したオリゴ	オリゴ配列	ベン 1 + 2 + 3	プローブの配列
配列 3	5'-GTA TGG AG-3'	1pmol/ $\mu$ l	1 内部ミスマッチ
配列 6	5'-GTA TGA AG-3'	1pmol/ $\mu$ l	マッチ

## 【0720】

12のスライド上に各ベン (pen) からそれぞれのオリゴヌクレオチドについて約1  $\mu$ lのスポットを10回繰り返した。

## 【0721】

## 【化32】

プローブ (LNA モノマーは太字):

- a) 配列 No.aZ1 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'
- b) 配列 No.aZ2 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'
- c) 配列 No.aZ3 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'
- d) 配列 No.16 5'-Cy3-CTT CAT AC-3'

## 【0722】

スライドおよびハイブリッド条件:

スライド1、2および3はaZ1プローブ @ 300fmol/ $\mu$ l, 30fmol/ $\mu$ l, 3fmol/ $\mu$ lとハイブリッドした。

スライド4、5および6はaZ2プローブ @ 300fmol/ $\mu$ l, 30fmol/ $\mu$ l, 3fmol/ $\mu$ lとハイブリッドした。

スライド7、8および9はaZ3プローブ @ 300fmol/ $\mu$ l, 30fmol/ $\mu$ l, 3fmol/ $\mu$ lとハイブリッドした。

スライド10、11および12は配列16 プローブ @ 300fmol/ $\mu$ l, 30fmol/ $\mu$ l, 3fmol/ $\mu$ lとハイブリッドした。

30  $\mu$ lハイブリッド化緩衝液(5 × SSC, 7% ラウリルサルコシンナトリウム)に希釀したプローブを各スライドの長さにそってピペットで移し、カバーガラスで覆い、プラスチック挿入体上部のプラスチックボックスに入れ、それを水で湿らせ

たペーパータオルの上に置いた。ボックスはアルミニウム箔で覆って光を遮断し、+4°Cで一晩インキュベートした。

### 【0723】

スライド洗浄：カバーガラスを取り除き、スライドをラックに挿入し(1つのラックに6個のスライド)、ガラス製スライド皿に置き、ホイルで包んだ：

### 【0724】

#### 【表12】

スライド番号	洗浄緩衝液(4°C)	洗浄時間	プローブ配列
1,2,3	5 x SSC, 0.1% Tween-20	2 x 5 分	配列 No. az1
4,5,6	5 x SSC, 0.1% Tween-20	2 x 5 分	配列 No. az2
7,8,9	5 x SSC, 0.1% Tween-20	2 x 5 分	配列 No. az3
10,11,12	5 x SSC, 0.1% Tween-20	2 x 5 分	配列 No. 16

### 【0725】

洗浄後、スライドを送風乾燥し、スキャンした。蛍光をスライドスキャナーに映し、データをイメージクオントソフトウェア(分子力学)(ImageQuant software (Molecular Dynamics))から分析した。図11に示すように、ミスマッチオリゴ3へのCy3標識プローブの結合は、非修飾プローブ(スライド10-12), 1重LNA修飾プローブaz1(slide 1-3)、1重LNA修飾プローブaz2(スライド4-6)または3重LNA修飾プローブaz3(スライド7-9)のいずれにおいても見られない(つまりミスマッチオリゴ3で得られたシグナルはバックグラウンドシグナルと同等)。相補的オリゴ6では、特異的なシグナルが全ての場合において見られる。これらのシグナルの強度はプローブ中に存在するLNAの数およびプローブ濃度に明らかに相関している。LNA T 残基はそれぞれ通常のDNAオリゴプローブよりも因数でシグナル強度を約2ほど増加させた。つまり、az1 および az2 = 2x 配列 16のシグナル、az3 = 8x 配列 16のシグナルである。マッチ/ミスマッチの区別はLNA T 塩基置換および増加したシグナル強度で良好であり、ミスマッチ区別は容易であると思われる。

## 【0726】

## 実施例 151

LNA修飾Cy3-標識8量体との末端ミスマッチのアレイでのハイブリッドおよび検出。

スライド調製：ガラススライドをアセトン中の10% アミノプロピルトリエトキシラン溶液を用いてアミノシラン化し、次いでアセトン中で洗浄した。以下のオリゴヌクレオチドを $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ でスライドにスポットした：

配列 No.9 5'-GTGTGGAG-3'

配列 No.15 5'-GTGTGGAA-3'

配列 No.131 5'-GTGTGGAT-3'

配列 No.132 5'-GTGTGGAC-3'

配列 No.133 5'-ATGTGGAA-3'

配列 No.134 5'-CTGTGGAA-3'

配列 No.135 5'-TTGTGGAA-3'

## 【0727】

それぞれ12のスライドに6ペンから各オリゴヌクレオチドについて約 $1\text{n}\mu\text{l}$ のスポットを10回繰り返した。

プローブ(LNAモノマーは太字)：

## 【0728】

## 【化33】

**DNA**

プローブ No.1:	5'-Cy3-TTCCACAC-3'
プローブ No.2:	5'-Cy3-GTCCACAC-3'
プローブ No.3:	5'-Cy3-ATCCACAC-3'
プローブ No.4:	5'-Cy3-CTCCACAC-3'
プローブ No.5:	5'-Cy3-TTCCACAT-3'
プローブ No.6:	5'-Cy3-TTCCACAG-3'

**LNA**

プローブ No.35Z-1:	5'-Cy3-TTCCACAC-3'
プローブ No.35Z-2:	5'-Cy3-GTCCACAC-3'
プローブ No.35Z-3:	5'-Cy3-ATCCACAC-3'
プローブ No.35Z-4:	5'-Cy3-CTCCACAC-3'
プローブ No.35Z-5:	5'-Cy3-TTCCACAT-3'
プローブ No.35Z-6:	5'-Cy3-TTCCACAG-3'

## 【0729】

LNAモノマーを有するプローブは配列番号の一部として予め35Z-とした。特異的LNAモノマーはイタリック体/太字で表記し、LNAオリゴの3'および5'末端に配置した。

## 【0730】

スライドおよびハイブリッド条件：各プローブ配列は別々のスライドでハイブリッドした。全てのプローブ濃度は1fmol/ $\mu$ lであった。各プローブをハイブリッド化緩衝液(5 × SSC, 7% ラウリルサルコシンナトリウム)で希釈し、その30 $\mu$ lを各スライドの長さにそってピペットで移し、カバーガラスで覆い、プラスチック挿入体上部のプラスチックボックスに入れ、水で湿らせたペーパータオル上に置いた。ボックスをアルミニウム箔で覆って光を遮断し、+4°Cで一晩インキュベートした。

## 【0731】

スライド洗浄：カバーガラスを取り除き、スライドをラックに挿入し(1つのラックに8個のスライド)、ガラス製スライド皿に置き、ホイルで包んだ。全てのスラ

イドを5×SSC 中で2×5分間、+4°Cで洗浄した。洗浄後、スライドを送風乾燥し、スキャンした。蛍光をスライドスキャナーに映し、データをイメージクオンソフトウェア（分子力学）から分析した。

### 【0732】

結論：図12および13に示すように、LNAスクレオシドを5'および3'末端に含むプローブでのマッチおよびミスマッチの標的配列の区別は、大部分において対応する非修飾オリゴスクレオチドよりも良好であった。

### 【0733】

DNAオリゴにおいて、C=T ミスマッチは例えばプローブ配列1が標的配列132とハイブリッドしたとき、およびプローブ配列5が標的配列134とハイブリッドした時において、最も区別が困難であった。T=TおよびG=Tミスマッチなどのその他のミスマッチは見ることができたが、これらのスポットは例えば標的配列135とそれぞれハイブリッドしたプローブ配列5および6においてやや強度が劣っていた。LNAオリゴでは他のミスマッチに匹敵するレベルまでこれらのC=TおよびT=Tミスマッチスポット強度が著しく減少した。プローブ配列1、2および3の相対的スポット強度はDNAおよびLNAオリゴと同様であった。しかしながら、プローブ配列4、5および6では、LNAオリゴはマッチ標的配列9、133および134とそれぞれハイブリッドした時にスポット強度の著しい増加を示した。

### 【0734】

#### 実施例 152

ATおよび全てのLNA修飾Cy3-標識8量体との末端ミスマッチのアレイ上でのハイブリッド化および検出。

スライド標本：ガラススライドをアセトン中の10% アミノプロピルトリエトキシラン溶液を用いてアミノシラン化し、次いでアセトン中で洗浄した。以下のオリゴスクレオチドを $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ でスライドにスポットした：

### 【0735】

配列 No.9 5'-GTGTGGAG-3'

配列 No.15 5'-GTGTGCAA-3'

配列 No.131 5'-GTGTGGAT-3'

配列 No.132 5'-GTGTCGAC-3'

配列 No.133 5'-ATGTCGAA-3'

配列 No.134 5'-CTGTCGAA-3'

配列 No.135 5'-TTGTCGAA-3'

【0736】

各36のスライドに6ペンのおののからオリゴヌクレオチドについてスポット毎に約1nlを10回スポットを繰り返した。

プローブ(LNAモノマーは太字):

【0737】

【化34】

**DNA:**

プローブ No.1: 5'-Cy3-TTCCACAC-3'

プローブ No.2: 5'-Cy3-GTCCACAC-3'

プローブ No.3: 5'-Cy3-ATCCACAC-3'

プローブ No.4: 5'-Cy3-CTCCACAC-3'

プローブ No.5: 5'-Cy3-TTCCACAT-3'

プローブ No.6: 5'-Cy3-TTCCACAG-3'

**AT LNA:**

プローブ No.ATZ-1: 5'-Cy3-TTCCACAC-3'

プローブ No.ATZ-2: 5'-Cy3-GTCCACAC-3'

プローブ No.ATZ-3: 5'-Cy3-ATCCACAC-3'

プローブ No.ATZ-4: 5'-Cy3-CTCCACAC-3'

プローブ No.ATZ-5: 5'-Cy3-TTCCACAT-3'

プローブ No.ATZ-6: 5'-Cy3-TTCCACAG-3'

**All LNA:**

プローブ No.AllZ-1: 5'-Cy3-TTCCACAC-3'

プローブ No.AllZ-2: 5'-Cy3-GTCCACAC-3'

プローブ No.AllZ-3: 5'-Cy3-ATCCACAC-3'

プローブ No.AllZ-4: 5'-Cy3-CTCCACAC-3'

プローブ No.AllZ-5: 5'-Cy3-TTCCACAT-3'

プローブ No.AllZ-6: 5'-Cy3-TTCCACAG-3'

**【0738】**

LNAモノマーを有するプローブは予め配列番号の一部としてATZ- または AllZ-とした。特異性LNAモノマーはLNAオリゴとしてイタリック体/太字で表記した。

**【0739】**

スライドおよびハイブリッド条件:各プローブ配列は別々のスライドでハイブリッドした。全てのプローブ濃度は $1\text{fmol}/\mu\text{l}$ であった。各プローブをハイブリッド化緩衝液( $5 \times \text{SSC}$ , 7% ラウリルサルコシンナトリウム)で希釈し、その $30\mu\text{l}$ を各スライドの長さにそってピペットで移し、カバーガラスで覆い、プラスチック挿入体上部のプラスチックボックスに入れ、水で湿らせたペーパータオル上に

置いた。ボックスをアルミニウム箔で覆って光を遮断し、室温で一晩インキュベートした。

#### 【0740】

スライド洗浄：カバーガラスを取り除き、スライドをラックに挿入し(1つのラックに9個のスライド)、ガラス製スライド皿に置き、ホイルで包んだ。全てのスライドを $5 \times$  SSC 中で $2 \times$  5分間、室温で洗浄した。洗浄後、スライドを送風乾燥し、スキャンした。蛍光をスライドスキャナーに映し、データをイメージクオンソフトウェア(分子力学)から分析した。

#### 【0741】

結論：図15A、15Bおよび15Cに示すように、DNAハイブリッドの室温での平均強度はATまたはすべてのLNA修飾オリゴで得られた強度の約10%であった。DNAプローブ5および6でハイブリッドしたスライドではどのようなスポットも見られなかつた。これらの条件はしたがって、DNAプローブでは最適ではない。しかし、マッチ/ミスマッチの区別はAおよびT塩基でのLNAヌクレオシドの置換では良好であった。AT LNAオリゴにおいてマッチ/ミスマッチの区別がそれほど良好でなかつたため、全てのLNAオリゴにおける説得力は際立って十分ではなかつた。

#### 【0742】

LNA修飾を有するオリゴは良好に機能した。最も区別が困難だったミスマッチは以下であった：

標的135へのプローブ 1 = CT ミスマッチ

標的131へのプローブ 2 = GTミスマッチ

標的15へのプローブ 3 = AAミスマッチ

標的131へのプローブ 4 = CTミスマッチ

標的135へのプローブ 5 = TTミスマッチ

標的135へのプローブ 6 = GTミスマッチ

標的133へのプローブ 6 = GAミスマッチ。

#### 【0743】

AT LNAオリゴはこれらミスマッチスポット強度が概して最大でマッチスポットの50%のとき良好な区別を示した。これらのミスマッチにおいて、全てのLNAオリ

ゴは適性スポット強度の約50から70%のミスマッチスポット強度を示した。全体として、LNA修飾によって高温を使用したハイブリッドおよび洗浄が可能になり、末端不適性が区別される。これらの結果は少なくとも4°CでハイブリッドしたDNAプローブに関して信頼できる(実施例151参照)。

## 【0744】

## 実施例 153

LNA T モノマーを含む配列 DNAテンプレートへの [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] ddNTP's およびサーモシーケンナーゼ (ThermoSequenase) (商標) DNAポリメラーゼの使用。

放射線標識ターミネーター配列決定反応を LNA T モノマーのDNAポリメラーゼのテンプレートとして受け入れられる能力を試験するために行った。15量体プライマー (配列: 5'- TGC ATG TGC TGG AGA -3')を次の短い配列を感作するために使用した(LNA モノマーは太字):

## 【0745】

## 【化35】

テンプレート 1 3'- ACG TAC ACG ACC TCT ACC TTG CTA -5'  
テンプレート TZ1 3'- ACG TAC ACG ACC TCT ACC TTG CTA -5'

## 【0746】

次の反応混合物を生成した:

## 【0747】

テンプレート 1 混合物:

$2\mu\text{l}$   $\times 16$  サーモシーケンナーゼ緩衝液  
 $6\mu\text{l}$  プライマー  $2\text{pmole}/\mu\text{l}$   
 $6\mu\text{l}$  テンプレート 1  $1\text{pmole}/\mu\text{l}$   
 $4\mu\text{l}$  水  
 $2\mu\text{l}$  サーモシーケンナーゼ DNAポリメラーゼ ( $4\text{U}/\mu\text{l}$ )  
 $20\mu\text{l}$  全容量

## 【0748】

テンプレート TZ1 混合物

$2\mu\text{l}$   $\times 16$  サーモシーケンナーゼ緩衝液

$6\mu\text{l}$  プライマー  $2\text{pmole}/\mu\text{l}$

$6\mu\text{l}$  テンプレート TZ1  $1\text{pmole}/\mu\text{l}$

$4\mu\text{l}$  水

$2\mu\text{l}$  サーモシーケンナーゼ DNAポリメラーゼ ( $4\text{U}/\mu\text{l}$ )

$20\mu\text{l}$  全容量

#### 【0749】

$2\mu\text{l}$  ヌクレオチド混合物 ( $7.5\mu\text{M}$  各dNTP) を8個の エッフェンドルフ (Eppendorf) チューブにそれぞれ加えた。  $0.5\mu\text{l}$  [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] ddATP をチューブ1および5に加えた。  $0.5\mu\text{l}$  [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] ddCTP をチューブ2および6に加えた。  $0.5\mu\text{l}$  [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] ddGTP をチューブ3および7に加えた。  $0.5\mu\text{l}$  [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] ddTTP をチューブ4および8に加えた。  $4.5\mu\text{l}$  のテンプレート TZ1混合物をチューブ1-4にそれぞれ加えた。  $4.5\mu\text{l}$  のテンプレート TZ1混合物をチューブ5-8にそれぞれ加えた。全ての反応を60℃で3分間インキュベートした。反応を  $4\mu\text{l}$  ホルムアミド/EDTA停止液を加えて停止した。反応を95℃で3分間熱し、その後19%ポリアクリルアミド 7M尿素ゲルに入れた。ゲルを10%メタノール中の10%酢酸中に固定し、次いで3MMの紙に移し、乾燥した。乾燥ゲルをKodak Biomaxオートラジオグラフィフィルムに暴露した。

#### 【0750】

結果を図18(トラック1-4)および図19に示す(5-8)。以下の反応に対応するトラックは:(図18):レーン1 - ddATP トラック。 レーン2 - ddCTP トラック。 レーン3 - ddGTP トラック, レーン4 - ddTTP トラック。 レーン5 - 8-32塩基オリゴマーカー; 図19: レーンA - 8-32塩基オリゴマーカー。 レーン5 - ddATP トラック。 レーン6 - ddCTP トラック。 レーン7 - ddGTP トラック。 レーン8 - ddTTP トラック。

#### 【0751】

図18および19から明らかなように、両方のテンプレートの全ての配列はオートラジオグラフィで容易に読み取ることができる。配列は5'-TCG AAC GTA- 3'で、テンプレート配列 3'-ACC TTG CTA- 5'に対応する。これにより、シングルLNA T

モノマーがポリメラーゼのテンプレートとして機能することがわかる。LNA T モノマーは取り込まれたddATPを用いて特に「T」として複写される。

### 【0752】

治療的応用

実施例 154

LNA修飾オリゴは細胞に転写可能である。放射線標識LNAオリゴを用いた実験。

### 【0753】

#### 【化36】

10 pmol のオリゴデオキシヌクレオチド(ODN) (ODN#10: 5'-TTA ACG TAG GTG CTG GAC TTG TCG CTG TTG TAC TT-3', ヒトカテブシン D に相補的な 35-量体) および 10 pmoles 2 個の LNA オリゴ: AL16 (5'-d(TGT GTG AAA TTG TTA T)-3', LNA ヌクレオシドは太字) および AL17 (5'-d(AT A AAG TGT AAA G)-3', LNA ヌクレオシドは太字) を

### 【0754】

キナーゼ緩衝液(50 mM Tris/HCl pH 7.6, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA)中のT4 ポリヌクレオチドキナーゼ (10ユニット, BRL cat. no. 510-8004SA), 5 μl ガンマ-<sup>32</sup>P-ATP 5000 Ci/mmol, 10 uCi/μl (Amersham)と混合した。試料を37°Cで45分間インキュベートし、その後68°Cで10分間熱し、次いで+0°Cにした。組み込まれていないヌクレオチドをクローマスピン (Chroma Spin) TE-10 カラム (Clontech cat. no. K1320-1)を通過させて除去した。収量はそれぞれODN#10, AL16およびAL17において、5×10<sup>5</sup> cpm/μl, 2×10<sup>5</sup> cpm/μl および 0.8×10<sup>5</sup> cpm/μlであった。本来ヒト細胞培養銀行 (Human Cell Culture Bank (Mason Research Institute, Rockville)) から得たMCF-7 ヒト胸部ガン細胞を25 cm<sup>2</sup> 細胞培養フラスコ (Nunc, NUNC)中の1%の熱不活化ウシ胎児血清(Gibco BRL), 6 ng/ml のウシインシュリン(Novo)および2.5 mM グルタマック (glutamax) (Life Technologies)で補強したDME/F12 培養培地 (1:1)で培養し、腐植化インキュベータで37°C、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>、75%N<sub>2</sub>でインキュベートした。MCF-7細胞は実験時において約40% 集密性 (confluent) であった。少量(0.1 pmol以下)のキナーゼ

化オリゴを $1.5 \mu\text{g}$  のpEGFP-NI プラスミド(Clontech cat. no. 60851)と混合し、 $100 \mu\text{l}$  希釀FuGENE6 形質移入剤(ベーリンガー・マンハイム cat no. 1 814 4 43)[希釀液:血清を含まない $95 \mu\text{l}$  のDME/F12 培養培地中の $5 \mu\text{l}$  のFuGENE6]と混合した。FuGENE6/DNA/オリゴ-混合物を成長するMCF-7細胞を粘着性の培養培地( $5 \text{ ml}$ )に直接加え、ほぼ製造者の指示どおりに細胞とともに18時間インキュベートした。3種類の実験1) ODN#10 + pEGFP-NI; 2) AL16 + pEGFP-NI; 3) AL17 + pEGFP-NIを設定した。DNA/LNA物質の細胞摂取は培地(アリコートはシンチレーターバイアルに移した)を含むFuGENE6/DNA/オリゴ-混合物を除去して調査した。細胞をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で一回洗浄し、新しい培養培地を加え、細胞を蛍光顕微鏡で調べた。緑色蛍光物質を含む約30%の形質移入細胞が見られ、約30%の細胞がpEGFP-NI プラスミドを摂取し、このプラスミドでコードされた緑色蛍光タンパク質を発現したことがわかる。蛍光顕微鏡検査の後、粘着性のMCF-7細胞を培養フラスコから取り出した。一時的に培養培地を取り出し、次いで細胞をPBS ( $\text{Mg}_2^+$  および  $\text{Ca}_2^+$  を含まない)中の0.25%トリプシン(Gibco BRL) 1 mM EDTA溶液で洗浄し、 $1 \text{ ml}$  トリプシン/EDTAを加え、細胞を $37^\circ\text{C}$ で10分間インキュベートした。インキュベート中、細胞は遊離し、シンチレーターバイアルに容易に再懸濁して移動した。次いで細胞を $10 \text{ ml}$  オプティフルー(Optifluor)シンチレーションカクテル(Packard cat. no. 6013199)を加えて完全に溶解させ、バイアルをWallac 1409 シンチレーション計数器で数えた。結果は以下のとおりである：1) ODN#10 + pEGFP-NI: 加えた放射線のうち約1.4%が細胞物質と結合した；2) AL16 + pEGFP-NI: 加えた放射線のうち約0.8%が細胞物質と結合した；3) AL17 + pEGFP-NI: 加えた放射線のうち約0.4%が細胞物質と結合した。加えた放射線の0.4 – 0.8%が細胞に摂取されたといえる。

### 【0755】

#### 実施例155

LNAを生体のヒトMCF-7胸部ガン細胞に効果的に運搬する。

ヒトMCF-7細胞によるLNA-摂取効率を高めるため、異なる形質移入剤をさまざまの濃度の5' FITC-標識LNAおよびDNAで試験した。下表に記載のオリゴヌクレオチドを試験した。

【0756】

【表13】

表：試験したオリゴヌクレオチド

名称	配列(LNAモノマーは太字)	特性
AL16	<b>5'-TGT GTG AAA TTG TTA T-3'</b>	LNA, 酵素, FITC-標識
AL17	<b>5'-ATA AAG TGT AAA G-3'</b>	LNA, 酵素, FITC-標識
EQ3009-01	<b>5'-TGC CTG CAG GTC GAC T-3'</b>	LNA-FITC-標識
EQ3008-01	<b>5'-TGC CTG CAG GTC GAC T-3'</b>	DNA-FITC-標識

【0757】

AL16およびAL17は実施例128に記載のように、FITCで酵素的に標識した。EQ3009-01およびEQ3008-01は標準固相化学によりFITCで標識した。3つの形質移入剤: FuGENE-6(ペーリンガー・マンハイム cat. no. 1814 443), スーパーフェクト(SuperFect) (Qiagen cat. no. 301305)およびリポフェクチン(Lipofectin) (GibcoBRL cat. no. 18292-011)を試験した。ヒトMCF-7胸部ガン細胞を先に記載のように(実施例154)培養した。実験の3日前に細胞を  $\text{cm}^2$ あたり約  $0.8 \times 10^4$  細胞の細胞密度で接種した。実験の種類に応じて、MCF-7細胞を標準T25フラスコ(Nunc, LifeTechnologies cat. no. 163371A)、24 ウエルマルチディッシュ(Nunc, LifeTechnologies cat. no. 143982A)またはスライドフラスコ(Nunc, LifeTechnologies cat. no. 170920A)に接種した。実験は細胞が30 - 40 %集密性のときに行った。LNAおよびDNAの細胞摂取は血清の非存在下で試験した。つまり細胞に形質移入混合物を加える前に通常の血清含有DME/F12培地を除去し、血清を含まないDME/F12と取替えた。この条件下で、スーパーフェクトはMCF-7細胞に対して毒性であることが証明された。スーパーフェクトとプラスミドDNA(pEGFP-N1, Clontech cat. no. 6085-1)、オリゴDNAまたはオリゴLNAのいずれかからなる形質移入混合物もまたMCF-7細胞に毒性であった。スーパーフェクトと異なり、FuGene6およびリポフェクチンはプラスミドDNA(pEGFP-N1)と良好に作用した。しかしながら

がら、リポフェクチンだけが生体MCF-7へのオリゴヌクレオチドの運搬を効果的に行うことができた。つまり、MCF-7細胞へのFITC-標識LNAおよびDNAの効果的な運搬は細胞を1% FCSを含むDME/F12中で約40%集密まで培養することにより得られる。次いでリポフェクチン試薬を血清を含まないDME/F12培地で40倍に希釈し、750 nMのオリゴ濃度でオリゴとあわせた。オリゴー・リポフェクチン複合体を室温で15分間形成させ、血清なしの培地で最終オリゴ濃度250 nM、0.8 ug/ml リポフェクチンまでさらに希釈する。次いで培地を細胞から除去してオリゴー・リポフェクチン複合体を含む培地と入れ替えた。細胞を37℃で6時間インキュベートし、血清なしのDME/F12培地で一回洗浄し、1%FCSを含むDME/F12にて37℃でさらに18時間インキュベートした。実験結果は培養フラスコ中または24 ウエルマルチディッシュ中の生体細胞のいずれかから直接、またはスライドフラスコで培養し、4%氷冷PFA中で固定した細胞で評価した。全ての場合において、高解像度CCDカメラを備えたLeica DMRB蛍光顕微鏡を使用した。生体細胞での結果を図16に、スライドフラスコで培養した固定細胞での結果を図17に示す。図16および17の細胞は共にFITC-標識AL16 LNA分子で形質移入された。いくつかの領域で細胞の全個数および緑色蛍光細胞を数えることにより、FITC-標識AL16 LNAがMCF-7細胞の約35%に形質移入されたことがわかる。重要なのはLNAが主に細胞の核に集中していることである(図17)。これは核による蛍光オリゴ摂取がアンチセンス活性に相関していることから(Stein C.A. ら、(1997) Making sense of antisense: A debate. In HMS Beagle: A BioMedNet Publication (<http://hmsbeagle.com/06/cutedge/overiew.htm>)注目に値する。オリゴおよびリポフェクチンの量を最終濃度のオリゴ1250 nM、リポフェクチン 4 ug/mlに高めたが、緑色蛍光細胞の比率はわずかに上昇しただけであった。濃度をこれ以上に高めることは細胞にとって有毒である。同様の結果が他のLNAおよびFITC-標識オリゴにおいても見られた(上記表参照)。結論として: 1) LNA はリポフェクチン-媒介形質移入により生体MCF-7胸部ガン細胞に効果的に運搬されうる。2) 30%以上の細胞の安定した高い細胞画分が、血清なしの成長培地mlあたりの最終濃度250 nM LNA, 0.8 ug リポフェクチンを用いて形質移入される。LNAおよびリポフェクチンの濃度を5倍以上に増加しても形質移入収量はわずかに上昇するだけである3)報告によるLNA

を細胞核に形質移入する方法は、このような形質移入LNAが細胞にアンチセンス効果をもたらすことを示唆している。

### 【0758】

#### 実施例 156

LNA修飾オリゴは細胞に転写可能である。フルオレセイン標識LNAオリゴを用いた実験。

2つのLNAオリゴ：

### 【0759】

#### 【化37】

AL16 (5'-TGT GTG AAA TTG TTA T-3', LNA ヌクレオシドは太字) および AL17  
(5'-ATA AAG TGT AAA G-3', LNA ヌクレオシドは太字)

### 【0760】

を実施例128に記載のようにフルオレセインを用いて標識した。MCF-7ヒト胸部ガン細胞を実施例154に記載のように培養した。3種類の実験：1)約1.5  $\mu$ g のFITC-標識AL16；2)約1.5  $\mu$ gのFITC-標識AL17；および3)約0.75  $\mu$ gのFITC-標識AL16および0.75  $\mu$ gのpRSV $\beta$ galプラスミド( $\beta$ -ガラクトシダーゼ酵素でコードされたバクテリアlac Z遺伝子を発現するプラスミド、 Tulchinsky ら、(1992) PNAS, 89, 9146-50)を設定した。2つのLNAオリゴおよびLNA-プラスミド混合物をFuGEN E6と混合し、実施例154に記載のようにMCF-7細胞に加えた。18時間インキュベートした後、細胞によるLNAオリゴの摂取を細胞培養の蛍光顕微鏡検査法により評価した。緑色蛍光物質を含む処理細胞の一部から(図16参照)、細胞がフルオレセイン標識LNAを摂取したことがわかる。フルオレセイン標識AL16はこの点においてフルオレセイン標識AL17よりも優れている。蛍光顕微鏡検査後、培養培地をフルオレセイン標識AL16とpRSV $\beta$ galの両方で処理した細胞から除去した。細胞をPBSで一回洗浄し、2% (v/v) ホルムアルデヒド、 0.2% (v/v) グルタルアルデヒド中で4°Cで5分間固定し、細胞を含む $\beta$ -ガラクトシダーゼを $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の存在下で無色から青色に変化するX-gal(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドイル $\beta$ -D-ガラクトピラノシド)で青色に染色した。X-gal染色により、 pRSV $\beta$ gal

が細胞中に効果的に移動したことがわかる。結論として、フルオレセインLNAオリゴは細胞に摂取された。

### 【0761】

#### 実施例 157

LNA修飾オリゴは細胞培養条件下では相対的に安定である。

実施例156に記載の蛍光顕微鏡検査に続き、フルオレセイン標識AL16 LNAのみで処理した細胞をさらに3日間インキュベートした。この期間中、緑色蛍光細胞の数は変化していなかったようであった。結論として、フルオレセイン標識LNAオリゴは細胞培養中の条件下において良好な安定性を有する。

### 【0762】

#### 実施例 158

覚醒ラットを用いた温水尾軽打テスト (Warm Water Tail Flick Test) におけるアンチセンス ロックされた核酸(LNA)による [D-Ala2] デルトロフィン (Deltorphin) -誘導痛みを与える効果 (Antinociception) の阻害。

オスのSprague-Dawley ラット(300 g)にポリエチレンカーテルをクモ膜下挿入し、注入の前に少なくとも5日間回復させた(コントロールも含む)。アンチセンス LNA化合物(注入あたり 12.5 および 2.5  $\mu$ g)を3日間にわたり 5  $\mu$ l 容量で1日2回投与した(08.00 および 17.00 h)。運動態度の観察や体重測定からわかるように、どのような非特異性効果または毒性の徴候も検出されなかった。最後の注入の翌日に、[D-Ala2]デルトロフィン (60  $\mu$ g, クモ膜下)をラットに注入し、温水(5 2°C)尾軽打試験でオピオイド受容体-媒介痛みを与える効果について試験した。データをグループ中6-8個体のメジアンとして図14に示す(パーセント最大可能応答へ変換したデータ、 % MPE)。統計的な分析を階数による Kruskal-Wallis 1-way ANOVAを用いて行い、次いで処理とコントロールを比較した。図14に示すように、デルトロフィンは生理食塩水で処理したコントロールにおいて強健な抗痛みを与える効果を發揮した。統計的にはこの応答は、生理食塩水で処理したコントロールと比較して両方のアンチセンス LNAグループ(12.5 および 2.5  $\mu$ g)において著しく抑制された。

### 【0763】

## LNA固形支持

## 実施例 159

DMT-LNA ヌクレオシドコハク酸塩の一般的方法。

塩基保護された DMT-LNA ヌクレオシドおよび無水コハク酸(1.5等量)を無水エチレンジクロライド(~10 ml/ヌクレオシドのg)に入れた。この混合物にトリエチルアミン(2等量)を加え、混合物を室温で攪拌した。反応をHPLC(トリチル化と同条件)で追跡した。完全に反応した後(>95%)、反応混合物を濃縮し、エチレンジクロライドおよびアセトニトリルと共に蒸発させ、真空中で乾燥してトリエチルアミンを除去した。残渣をエチレンジクロライドまたは酢酸エチル(~100 ml/出発のヌクレオシドのg)に溶解し、冷たい10%クエン酸(3 × 80 ml/g)および冷水(3 × 80 ml/g)で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、1-2 等量のトリエチルアミンを加えるかまたは加えずに濃縮した。残渣の固体を無水アセトニトリル(2-3x)と共に蒸発させ、真空中で乾燥し、白色固形物として純粹生成物を得た。

## 【0764】

LNAヌクレオシド支持体の一般的方法。

塩基保護されたDMT-LNA-ヌクレオシドコハク酸塩(遊離酸またはトリエチルアンモニウム塩、 $65 \mu\text{mol}$ /支持体のg)、アミノ誘導支持体(Primer Support™ 30HL,  $160 \mu\text{mol}$  のアミノ基/支持体のg)、DMAP(3 mg/支持体のg)および1-(3-[ジメチルアミノ]プロピル)-3-エチルカルボジミド塩酸塩(80 mg/支持体のg)を無水ピリジン(6 ml/支持体のg)に入れた。この混合物にトリエチルアミン( $16 \mu\text{l}$ /支持体のg)を加え、混合物を振盪装置で一晩150 rpmに維持した。支持体を濾過し、メタノール(3 × 10 ml/支持体のg)およびジクロロメタン(3 × 10 ml/支持体のg)で洗浄した。空気乾燥後、支持体を真空中で0.5時間乾燥した。これに無水アセトニトリル中の6% DMAP(Cap A, 支持体の~3 ml/g)および20%無水酢酸/30% 2,4,6-コリジン/50% アセトニトリル(Cap B, 支持体の~3 ml/g)の混合物を加えた。混合物を振盪装置で5時間維持した。支持体を濾過し、無水ジクロロメタン(2 × 10 ml/支持体のg)で洗浄し、上記のように乾燥した。これをCap AおよびCap B(合計容量 6 ml/支持体のg)の混合物に再懸濁し、振盪装置で一晩維持し

た。支持体を濾過し、メタノール ( $6 \times 10 \text{ ml}$ /支持体のg)、ジクロロメタン ( $3 \times 10 \text{ ml}$ /支持体のg)で洗浄し、空気中で乾燥した。これをさらに真空中で5-6時間乾燥した。装填量をジメトキシトリチルアッセイによって測定したところ、約  $40 \mu\text{mol/g}$  であった。

## 【0765】

## 実施例 160

LNA T モノマーを含むポリdTプライマーを用いた第1の鎖cDNA合成。

LNA T 残基を含むポリdT プライマーの第1鎖cDNA合成を感作する能力を試験するため、反応を設定した。以下のポリdTプライマーを試験した(LNAモノマーは太字):

## 【0766】

## 【化38】

RTZ1 5'-TTT TTT TTT TTT TT-3'  
 RTZ2 5'-TTT TTT TTT TTT TT-3'  
 RTZ3 5'-TTT TTT TTT TTT TT-3'  
 RTZ4 5'-TTT TTT TTT TTT TT-3'  
 RTZ5 5'-TTT TTT TTT T-3'

## 【0767】

RPK0140 キット Cy 染料 cDNA 標識キット (Amersham Pharmacia Biotech)からの固定ポリdTプライマーをコントロールとした。

## 【0768】

反応を上記プライマーのそれぞれに対し、以下のように設定した:

## 【0769】

$1 \mu\text{l}$  シロイヌナズナ mRNA  $0.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$   
 $2 \mu\text{l}$  ポリdTプライマー  $8\text{pmole}/\mu\text{l}$   
 $4 \mu\text{l}$   $\times 5$  AMV 逆転写酵素緩衝液  
 $1 \mu\text{l}$  水  
 $8 \mu\text{l}$  全容量

## 【0770】

この混合物を75°Cで3分間熱し、次いで少なくとも10分間室温に冷却した。

### 【0771】

次いで下記のものをそれぞれの反応に加えた：

$1\mu\text{l}$  80mM ピロリン酸ナトリウム  
 $1\mu\text{l}$  ヒト胎盤リボヌクレアーゼ阻害因子20U/ $\mu\text{l}$   
 $7\mu\text{l}$  0.5mM dNTP 溶液  
 $2\mu\text{l}$  [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] dATP 10mCi/ml 3000Ci/mmol  
 $1\mu\text{l}$  AMV 逆転写酵素 20U/ $\mu\text{l}$   
 $20\mu\text{l}$  全容量

### 【0772】

反応を42°Cで2時間インキュベートした。次いで反応を95°Cで3分間熱し、その後6%ポリアクリルアミド7M尿素ゲルに入れた。ゲルを10%酢酸/10%メタノール中に固定し、その後3MMの紙に移して乾燥した。乾燥したゲルを一晩Kodak Biomaxオートラジオグラフィフィルムに暴露した。

### 【0773】

オートラジオグラフィにより、オリゴヌクレオチドプライマー RTZ1-4を含むLN AはcDNA合成を効果的にプライムすることができたことがわかる。この反応中で得られたcDNA生成物の量および強度はコントロールの固定ポリdTオリゴヌクレオチドのものと同一であった。RTZ 5はいくらかのcDNAを生成したが、収量は対照のオリゴプライマーの収量と比べて著しく低かった。

### 【0774】

実施例 161

セファロースビーズに共有結合的に付着したLNA-修飾オリゴヌクレオチドはRNA分子の配列特異的捕捉において効果的に機能する。

化学(Amy Mueller)によって3つのオリゴを合成し、ポリ(rA)結合について評価した。

### 【0775】

【化39】

- NH<sub>2</sub>(T8)-T コントロール
- NH<sub>2</sub>(T15)-T コントロール
- NH<sub>2</sub>(LNA-T8)-T テスト

## 【0776】

200 nmol の各オリゴをパンフレットの指示に従って 50 mg の調製した CNBr-活性化セファロース 4B (Pharmacia) と結合させた。樹脂中の未反応の結合部位は 100 nM Tris pH 8.0 中でブロックした。

## 【0777】

## 【表14】

オリゴ結合データの表

工程	T9 オリゴ A <sub>260</sub> ユニット	T16 オリゴ A <sub>260</sub> ユニット	LNA T9 オリゴ A <sub>260</sub> ユニット	コントロール オリゴ無し
反応したオリゴ	14.7 (200nM)	26.0 (200 nM)	14.7 (200 nM)	0
未結合オリゴ	5.50	10.43	4.20	-
∴結合オリゴ	9.20	15.57	10.50	-
結合%	62.6%	59.9%	71.4%	-

## 【0778】

ポリ(rA)結合分析を2回行うためにオリゴ結合樹脂を2つの部分に分割した(それぞれ~25 mg樹脂)。ポリ(rA) (ファルマシア) #27-4110-01 (結合緩衝液に 28.2 A<sub>260</sub> ユニット/ml で溶解)を結合するために使用した。SOP QC 5543にしたがって 5つのA<sub>260</sub> ユニットを 2つのオリゴ結合樹脂 25 mg に結合させた。未結合の「前進 (breakthrough)」ポリ(rA)をA<sub>260</sub> 吸收度により数値化し、結合を計算するために用いた。結合ポリ(rA)の運命は低塩緩衝液による洗浄および数回の溶出により追跡した。表10に示すように、LNAおよびDNAの両方でコートしたビーズはポリ(rA)標的分子の捕捉において効果的に機能した。しかしながら異なるビーズのポリ(rA)溶出プロフィールからわかるように、LNAでコートしたビーズはDNAでコートしたビーズよりも強固にポリ(rA)ターゲットに結合した。結論として、1)LNA T9オリゴはA残基の伸長を含むRNA分子の捕捉において効果的であり、2)捕捉さ

れたRNA分子は対照のDNA T9およびDNA T16オリゴよりもさらに強固にLNA T9オリゴピーズに結合することがいえる。

【0779】

【表1】

表1  
モノマーZ

才リゴ	標的	$T_m$	$T_m$ (°C) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{EDTA}$	$T_m$ (°C) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl/EDTA}$	$T_m$ (°C) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{TMAC}$
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3' 5'-d(GCATTTCAC)-3' 5'-d(GCATGTCAC)-3' 5'-d(GCATCTCAC)-3' 5'-d(GCATAACAC)-3' 5'-d(GCATAGCAC)-3' 5'-d(GCATACAC)-3' 5'-d(GCAUAUCAC)-3' 5'-d(GCAUCUCAC)-3'	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	28 12 19 11 12 <10 <10 28 10	42 31 23 30 38	42 31 23 30 33
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3' 5'-d(GCATTTCAC)-3' 5'-d(GCATGTCAC)-3' 5'-d(GCATCTCAC)-3' 5'-d(GCATAACAC)-3' 5'-d(GCATAGCAC)-3' 5'-d(GCATACAC)-3' 5'-d(GCAUAUCAC)-3' 5'-d(GCAUCUCAC)-3'	10 11 12 13 14 15 15A 16 17	44 27 30 23 28 28 29 50 17	56 43 43 38	43 43 38

表1(つづき)

オリゴ マーク	標的 DNA	T <sub>m</sub> No.	T <sub>m</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /EDTA	T <sub>m</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl/EDTA	T <sub>m</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /TMAC
S'-d(GTGAGATGC)-3'	S'-d(GCATATCAC)-3' S'-d(GCATTTCAC)-3' S'-d(GCATGTCAC)-3' S'-d(GCATCTCAC)-3' S'-d(GCATAAACAC)-3' S'-d(GCATAGCAC)-3' S'-d(GCATACCAC)-3' S'-(GCAUAUCAC)-3' S'-(GCAUCUCAC)-3'	18 19 20 21 22 23 24 24A 24B		26 33 28 49 <15 <15 <15 34 59	39 44 38 57
S'-d(GTGAUATGC)-3'	S'-d(GCATATCAC)-3' S'-d(GCATTTCAC)-3' S'-d(GCATGTCAC)-3' S'-d(GCATCTCAC)-3' S'-d(GCATAAACAC)-3' S'-d(GCATAGCAC)-3' S'-(GCATACCAC)-3'	25 26 27 28 29 30 31		44 25 32 24 27 28 20	56 44 43 37
S'-d(GTGAGATGC)-3'	S'-d(GCATATCAC)-3' S'-d(GCATTTCAC)-3' S'-d(GCATGTCAC)-3' S'-d(GCATCTCAC)-3' S'-d(GCATAAACAC)-3' S'-d(GCATAGCAC)-3' S'-(GCATACCAC)-3'	32 33 34 35 36 37 38		17 16 15 33 33 <5 <5	34 30 28 44
S'-d(GTGAGATGC)-3'	S'-d(GCATATCAC)-3'	38A		33	

【0 7 8 1】

【表1】

表1(つづき)

オリゴ	標識	T <sub>m</sub>	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl/EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /TMAC
S'-d(GGTGGTTTGTGG)-3'		39	31	47	55
S'-d(CAAACAAACCACA)-3'	39A	32		52	
S'-(CAAACAAACCACA)-3'			67		
S'-d(GGTGGTTTGTGG)-3'		40	40	57	
S'-d(CAAACAAACCACA)-3'	40A	50		70	
S'-(CAAACAAACCACA)-3'					
d(GGTGGTTTGTGG)-3'		41	67	83	
S'-d(CAAACAAACCACA)-3'	41A	85		>93	
S'-(CAAACAAACCACA)-3'					
S'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'		42		36	
S'-d(AAAAAAAAACAAAAAA)-3'		43		32	
S'-(AAAAAAAACAAAAAA)-3'					
S'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'		44		36	
S'-d(AAAAAAAAACAAAAAA)-3'		45		32	
S'-(AAAAAAAACAAAAAA)-3'					
S'-d(TTTTTTTTTTTTTT)-3'		46		34	
S'-d(AAAAAAAAACAAAAAA)-3'	47			40	
S'-(AAAAAAAACAAAAAA)-3'					

表1(つづき)

オリゴ 標的	T <sub>a</sub> No.	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl/EDTA	T <sub>a</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /TMAc
5'-d(TTTTTTTTTTT)-3' 5'-d(AAAAAAAAGAAA)-3' 5'-d(AAAAAAAAGAAA)-3'	48 49	42 52		
5'-d(TTTTTTTTTT)-3' 5'-d(AAAAAAAAGAAA)-3' 5'-d(AAAAAAAAGAAA)-3'	50 51	47 53		
5'-d(TTTTTTTT)-3' 5'-d(AAAAAAAAGAAA)-3' 5'-d(AAAAAAAAGAAA)-3'	52 53	80 70		
5'-d(AAAACAAA)-3' 5'-d(AAAAGAAA)-3' 5'-d(AAAATAAAA)-3'	54 55 56	63 55 65		
5'-d(GTGAAATGC)-3' 5'-d(GCATATCAC)-3' 5'-d(GCATTCAC)-3'	57 58 59	26 45 23		
5'-d(GCATGTCAC)-3' 5'-d(GCATCTCAC)-3' 5'-d(GCATCATGC)-3' 5'-d(GTGA <sup>m</sup> CATGC)-3' 5'-d(GCATATCAC)-3'	60 61	25 <15		
5'-d(GTGA <sup>m</sup> CATGC)-3' 5'-d(GCATATCAC)-3' 5'-d(GCATTTCAC)-3' 5'-d(GCATCTCAC)-3' 5'-d(GCATGTCAC)-3'	63 64 65 66	32 27 53 32		

【0783】

【表1】

表1(つづき)

オリゴ マーク	標的	T <sub>m</sub> No.	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /TMAC
S'-d(GTGACATGC)-3'				
S'-d(GCATATCAC)-3'		67	32	
S'-d(GCATGTCAC)-3'		69	52	
S'-d(GTGATATG <sup>M</sup> C)-3'				
S'-d(GCATATCAC)-3'		71	64	
S'-d(GCATGTCAC)-3'		73	52	
S'-d(GCAUAUCAC)-3'		75	74	
S'-d(GCAUCUCAC)-3'		76	60	
S'-d(CACTATAAG)-3'		77	40	
S'-d(GTGTTTGGC)-3'		78	52	
S'-d(GCAAAACAC)-3'				

表2  
モノマーV  
オリゴ

標的	T <sub>m</sub> No.	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl/EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /TMAC
5'-d(TTTTTTTTTTT)-3'				
5'-d((AAAAAAAAGAAA)-3'				32
5'-(AAAAAAAAGAAA)-3'				27
5'-d(TTTTTTTTTTT)-3'				
5'-d((AAAAAAAAGAAA)-3'				31
5'-(AAAAAAAAGAAA)-3'				28
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'				
5'-d((AAAAAAAAGAAA)-3'				30
5'-(AAAAAAAAGAAA)-3'				23
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'				
5'-d((AAAAAAAAGAAA)-3'				23
5'-(AAAAAAAAGAAA)-3'				31
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'				
5'-d((AAAAAAAAGAAA)-3'				23
5'-(AAAAAAAAGAAA)-3'				16
5'-d(TTTTTTTTTT)-3'				
5'-d((AAAAAAAAGAAA)-3'				<10
5'-(AAAAAAAAGAAA)-3'				42
5'-(AAAAAAAGAAA)-3'				37
5'-d(GTGATATGC)-3'				26
5'-d(GCATATCAC)-3'				27
5'-(GCAUAUCAC)-3'				

【0 7 8 5】

【表3】

表3  
モノマーX

【0786】

オリゴ マーX	標的 物質	T <sub>m</sub> No.	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl/EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /TMAC
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		23			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		23			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		19			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		23			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		9			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		15			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		5			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		14			

【表4】

モノマーY  
オリゴ

	標的	No.	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaCl/EDTA	T <sub>m</sub> (°C) Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /TMAC
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		36			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		37			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		35			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		37			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		35			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		36			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		32			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		33			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		36			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		36			
5'-d(TTTTTTTTTTTT)-3'					
5'-d(AAAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		58			
5'-(AAAAAA <sub>n</sub> AAA)-3'		58			

【0787】

【表4】

表4(つづき)  
モノマーY

オリゴ 標的	$T_m$ No. ( $^{\circ}\text{C}$ ) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{EDTA}$	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaCl/EDTA}$	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{TMAC}$
5'-d(GTGATATGC)-3'	35		
5'-d(GCATATCAC)-3'		35	
5'-(GCAUAUCAC)-3'			

【表5】

才リゴ	標的	$T_m$			融点 $(T_m^{\circ}C)$		
		No.	Y=A	Y=C	Y=T	Y=G	
5'-r(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATYTCAO)-3'	1	55	34	38	37	
5'-r(GUGAUAAUGC)-3'	5'-d(GCATYTTCAC)-3'	2	27	<10	<10	<10	
5'-r(GTGATATGC)-3'	5'-r(GCAUYUCAC)-3'	3	63	45	-	-	
5'-r(GUGAUAAUGC)-3'	5'-r(GCAUYUCAC)-3'	4	38	22	-	-	

【0 7 8 9】

【表6】

表6  
モノマーZ

オリゴ	標的	$T_m$	No.	融点( $T_m/^\circ C$ )
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	1		28
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	2		44
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	3		40
5'-d(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	4		63
5'-r(GTGATATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	5		74
5'-r(GTGATATG <sup>M</sup> C)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	6		85

【表7】

表7  
モノマーZ(全てのホスホモノチオエートオリゴヌクレオチド)

オリゴ	標的	$T_m$ No.	融点( $T_m$ /°C)
$5'-d(G^sT^sG^sA^sT^sA^sT^sG^sC)-3'$	$5'-d(GCATATCAC)-3'$	1	21
$5'-d(G^sT^sG^sA^sT^sA^sT^sG^sC)-3'$	$5'-r(GCAUAUCAC)-3'$	2	17
$5'-d(G^sT^sG^sA^sT^sA^sT^sG^sC)-3'$	$5'-d(GCATATCAC)-3'$	3	41
$5'-d(G^sT^sG^sA^sT^sA^sT^sG^sC)-3'$	$5'-r(GCAUAUCAC)-3'$	4	47

【0 7 9 1】

【表8】

表8  
モノマー-チオ-Z(U<sup>s</sup>)

オリゴ	標的	T <sub>m</sub> No.	融点(T <sub>m</sub> /°C)
5'-d(GTGAU'ATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	1	34
5'-d(GTGAU'ATGC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	2	36
5'-d(GU'GAU'AUGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	3	42
5'-d(GU'GAU'AUGC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	4	52
5'-d(GU'GAU'AUGC)-3'	5'-(GCAAAACAC)-3'	5	27
5'-d(GUGU'U'U'GC)-3'	5'-d(GCAAAACAC)-3'	6	51

【表9】

モノマー アミノ-Z(T<sup>NH</sup>)およびメチルアミノ-Z(T<sup>NMe</sup>)

オリゴ	標的	T <sub>m</sub>	融点 (T <sub>m</sub> /°C)
No.			
5'-d(GTGAT <sup>NH</sup> ATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	1	33
5'-d(GTGAT <sup>NH</sup> ATGC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	2	34
5'-d(GT <sup>NH</sup> GAT <sup>NH</sup> AT <sup>NH</sup> GC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	3	39
5'-d(GT <sup>NH</sup> GAT <sup>NH</sup> AT <sup>NH</sup> GC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	4	47
5'-d(GTGAT <sup>NM</sup> ATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	5	33
5'-d(GTGAT <sup>NM</sup> ATGC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	6	36
5'-d(GTGAT <sup>NM</sup> ATGC)-3'	5'-d(GCATATCAC)-3'	7	39
5'-d(GT <sup>NM</sup> GAT <sup>NM</sup> AT <sup>NM</sup> GC)-3'	5'-(GCAUAUCAC)-3'	8	49
5'-d(GT <sup>NM</sup> GAT <sup>NM</sup> AT <sup>NM</sup> GC)-3'	5'-d(GCAAAACAC)-3'	9	47
5'-d(GT <sup>NM</sup> GAT <sup>NM</sup> AT <sup>NH</sup> T <sup>NM</sup> GC)-3'	5'-(GCAAAACAC)-3'	10	63

【0793】

【表10】

表10

工程	T9 オリゴ A <sub>260</sub> ユニット	T16 オリゴ A <sub>260</sub> ユニット	LNA T9 オリゴ A <sub>260</sub> ユニット	オリゴ対照なし
ボリ(rA) 添加	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0	5.0/5.0
ボリ(rA) 進展	1.75/1.61	1.84/1.78	1.83/1.82	5.09/5.14
∴ボリ(rA)結合	3.25/3.39	3.16/3.22	3.17/3.18	0.0/0.0
% ボリ(rA)結合	65.0%/67.8%	63.2%/64.4%	63.4%/63.6%	0.0%/0.0%
低塩洗浄/溶出	0.24/0.24	0.11/0.12	.053/.055	0.14/0.13
TE 溶出、15分、室温	2.37/2.72	0.83/0.93	0.02/0.04	0.01/0.02
TE 溶出、一晩、室温	0.38/0.37	1.76/1.69	0.11/0.07	.003/.004
TE 溶出、30分、65°C	.047/.040	0.38/0.46	1.62/1.70	.005/.004
10 mM Tris pH 10 溶出	.002/.002	0.03/0.03	0.10/0.10	0.01/0.01
1 mM HCl pH 4.0 溶出	0.07/0.06	0.06/0.04	0.26/0.23	0.01/0.01
回収した A <sub>260</sub> の平均	3.20	3.14	2.18	-
回収した A <sub>260</sub> の平均%	96.4%	98.4%	68.7%	-

【0794】

**【図面の簡単な説明】**

**【図 1】**

図 1 A および 1 B は、公知の配座的に束縛されたヌクレオチド類を示す。

**【図 2】**

図 2 は、この発明のヌクレオチド／ヌクレオシド類似体を示す。

**【図 3】**

図 3 は、PCR アンプリコンの配列特異的捕捉における LNA 修飾オリゴヌクレオチド類の性能を示す。

**【図 4】**

図 4 A および 4 B は、LNA 修飾オリゴヌクレオチド類が鎖侵入によりその同族の PCR アンプリコンを捕捉し得ることを示す。

**【図 5】**

図 5 は、固体表面上に固定された LNA 修飾オリゴヌクレオチド類が、PCR アンプリコンの配列特異的捕捉において効果的に機能することを示す。

**【図 6】**

図 6 は、LNA 修飾オリゴヌクレオチド類が T4 ポリヌクレオチドキナーゼの基質として行動しうることを示す。

**【図 7】**

図 7 は、LNA 修飾オリゴヌクレオチド類が核酸ポリメラーゼ類のプライマーとして機能しうることを示す。

**【図 8】**

図 8 は、LNA 修飾オリゴヌクレオチド類がターゲット増幅工程においてプライマーとして機能しうることを示す。

**【図 9】**

図 9 は、5'アントラキノンを有する LNA 修飾オリゴヌクレオチド類が照射により固体支持体上に共有結合的に固定されることができ、かつ固定されたオリゴマーが相補的 DNA オリゴの捕捉において効果があることを示す。

**【図 10】**

図 10 は、LNA-チミジン-5'-トリホスフェート (LNA-TTP) がターミナルデオ

キシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) の基質として行動しうることを示す。

【図11】

図11は、異なる LNA 修飾 Cy3-標識化8量体とのアレイ上のハイブリッド化および検出を示す。

【図12】

図12および13は、LNA 修飾 Cy3-標識化8量体とのアレイ上の末端ミスマッチのハイブリッド化および検出を示す。

【図13】

図12および13は、LNA 修飾 Cy3-標識化8量体とのアレイ上の末端ミスマッチのハイブリッド化および検出を示す。

【図14】

図14は、覚醒ラットにおける温水尾はね試験での [D-Ala2] デルトルフィン (deltorphin)-誘導 アンチノシセプション (antinociception) の LNA による阻害を示す。

【図15】

図15A、15Bおよび15Cは、AT および全 LNA 修飾 Cy3-標識化8量体とのアレイ上の末端ミスマッチのハイブリッド化および検出を示す。

【図16】

図16および17は、LNA が生体ヒト MCF-7 乳がん細胞に届けられうることを示す。

【図17】

図16および17は、LNA が生体ヒト MCF-7 乳がん細胞に届けられうることを示す。

【図18】

図18および19は、[ $\alpha^{33}$ P] ddNTP's および サーモシークエンス (ThermoS sequenase) <sup>TM</sup> DNA ポリメラーゼのLNA T モノマー類を含有する配列 DNA テンプレートへの使用を示す。

【図19】

図18および19は、[ $\alpha^{33}\text{P}$ ] ddNTP's および サーモシークエンス (ThermoS equenase)™ DNA ポリメラーゼのLNA T モノマー類を含有する配列 DNA テンプレートへの使用を示す。

#### 【図20】

図20および21は、エキソヌクレアーゼのないクレノウフラグメントDNA ポリメラーゼ I が LNA アデノシン、シトシン、グアノシンおよびウリジン-5'-トリホスフェート類を DNA 鎖内に組みこむことができるのを示す。

#### 【図21】

図20および21は、エキソヌクレアーゼのないクレノウフラグメントDNA ポリメラーゼ I が LNA アデノシン、シトシン、グアノシンおよびウリジン-5'-トリホスフェート類を DNA 鎖内に組みこむことができるのを示す。

#### 【図22】

図22は、末尾 LNA 修飾オリゴヌクレオチドに対するターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TdT) の可能性を示す。

#### 【図23】

図23Aおよび23Bは、完全に混合した LNA モノマー類が PCR アンプリコンの配列特異的捕捉において固定化されたビオチニル化-DNA オリゴの性能を著しく増加させるのに使用され得るのを示す。

#### 【図24】

図24～41は、この発明の LNA モノマー類への可能な合成ルートを示す。

#### 【図25】

図24～41は、この発明の LNA モノマー類への可能な合成ルートを示す。

#### 【図26】

図24～41は、この発明の LNA モノマー類への可能な合成ルートを示す。

#### 【図27】

図24～41は、この発明の LNA モノマー類への可能な合成ルートを示す。

#### 【図28】

図24～41は、この発明の LNA モノマー類への可能な合成ルートを示す。

#### 【図29】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図30】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図31】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図32】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図33】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図34】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図35】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図36】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図37】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図38】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図39】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図40】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図41】

図24～41は、この発明のLNAモノマー類への可能な合成ルートを示す。

【図1A】

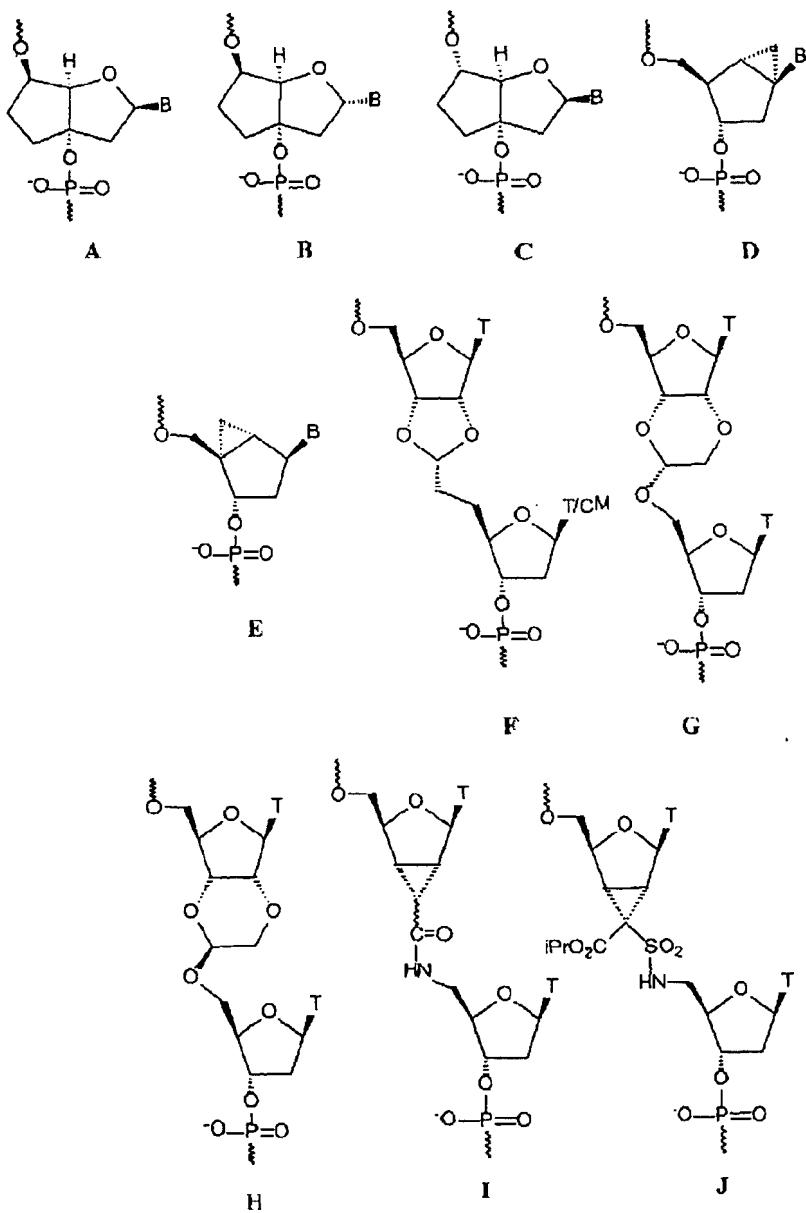


Fig. 1 A

【図1B】

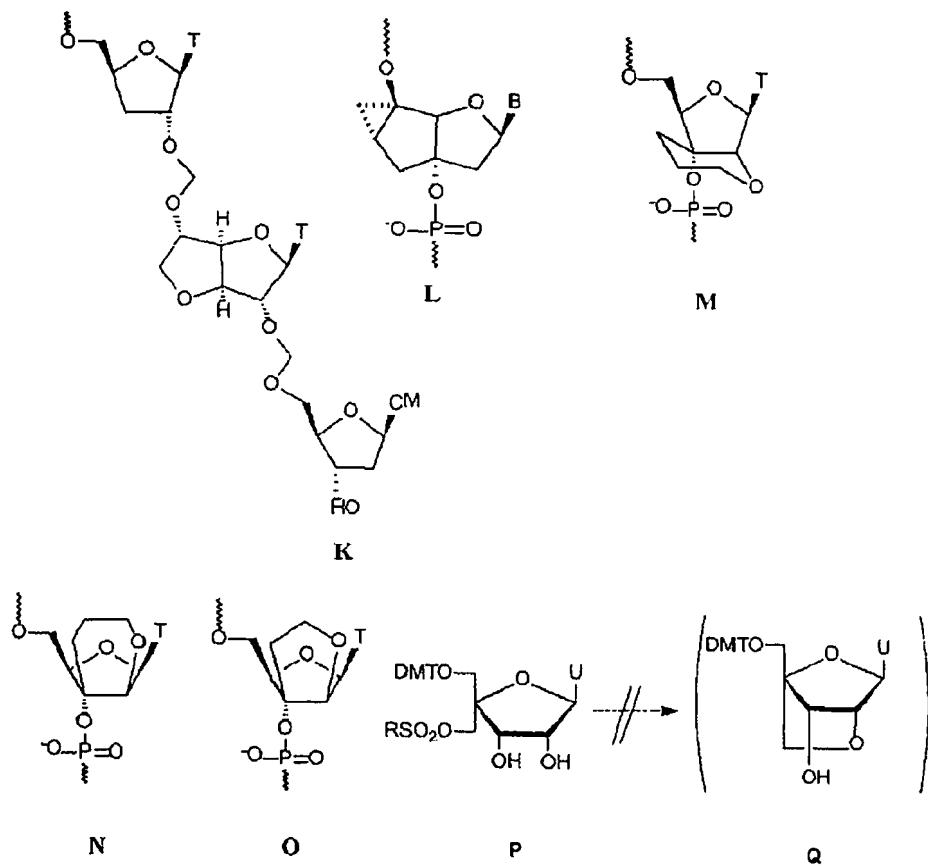
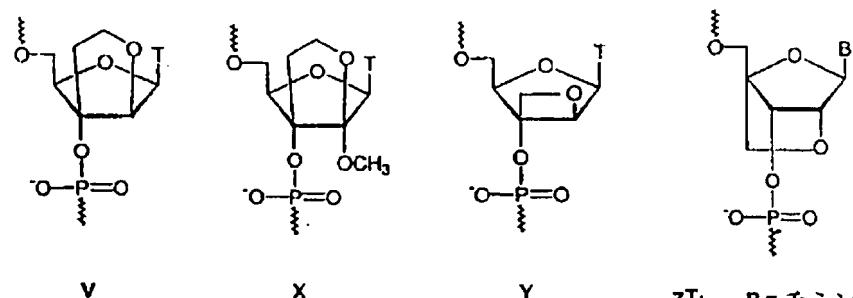


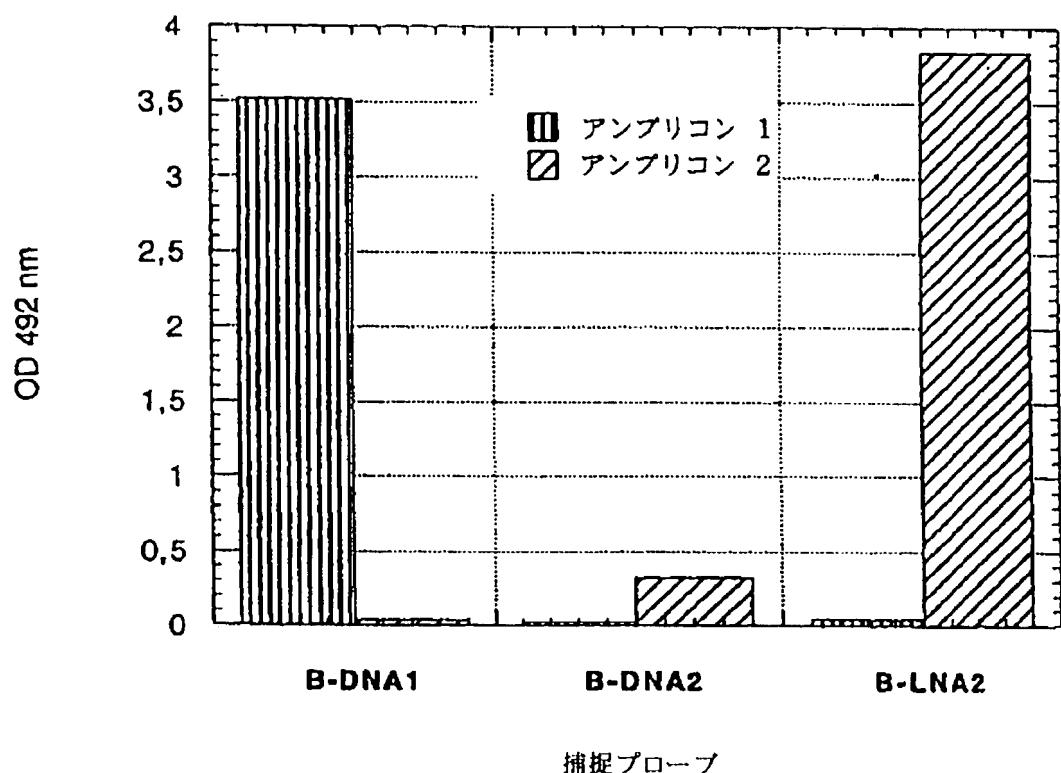
Fig. 1B

【図2】

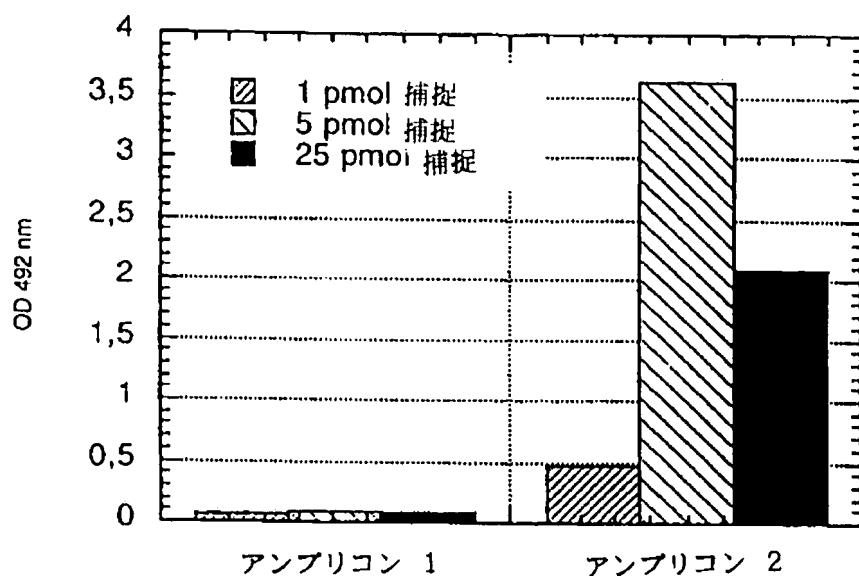


ZT: B = チミン-1-イル  
 ZU: B = ウラシル-1-イル  
 ZG: B = グアニン-9-イル  
 ZC: B = シトシン-1-イル  
 ZA: B = アデニン-9-イル  
 ZMeC: B = 5-メチルシトシン-1-イル

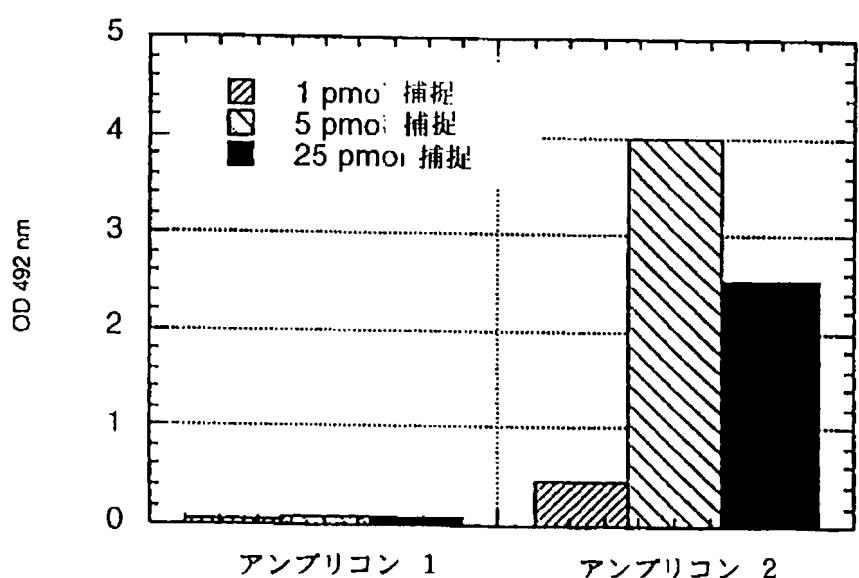
【図3】



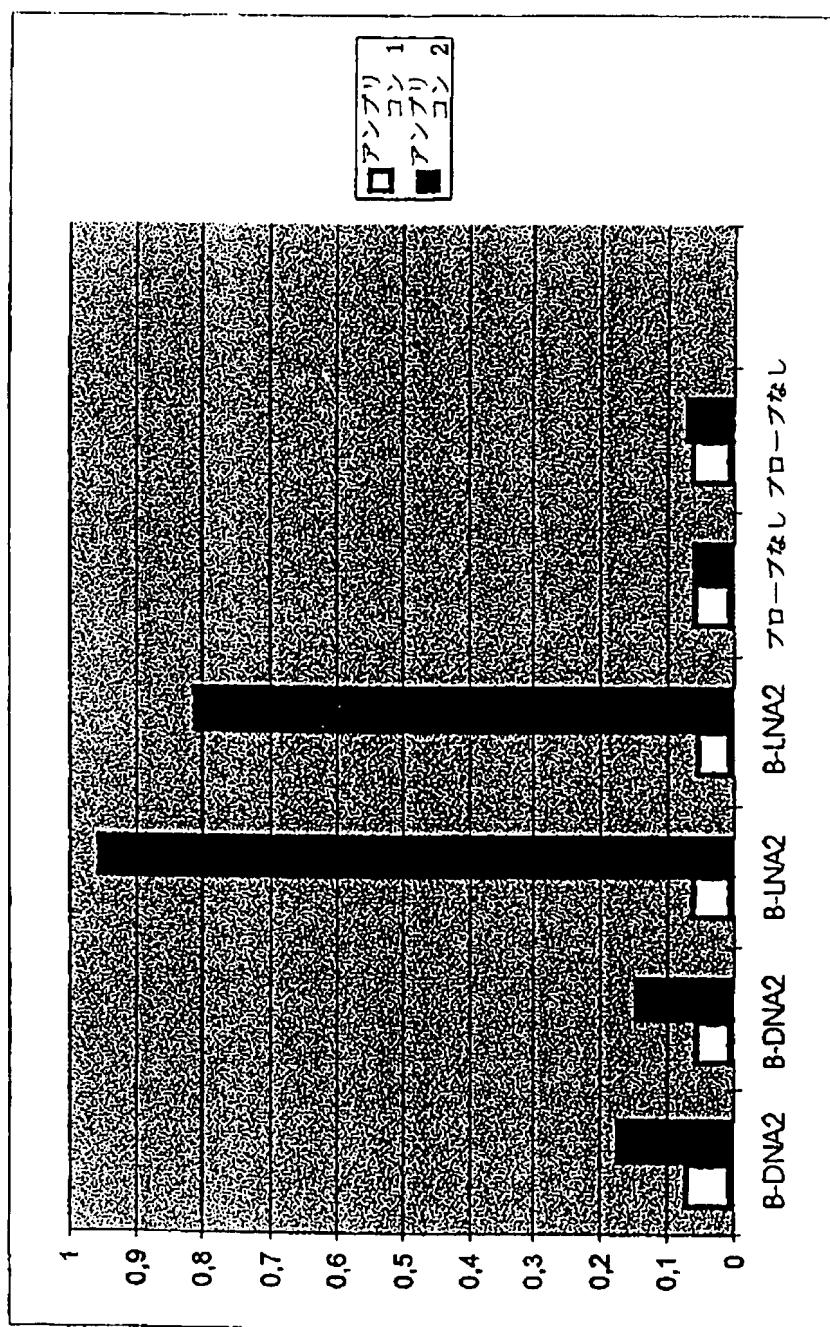
【図4A】



【図4B】



【図5】



【図6】

1 2 3 4 5 6

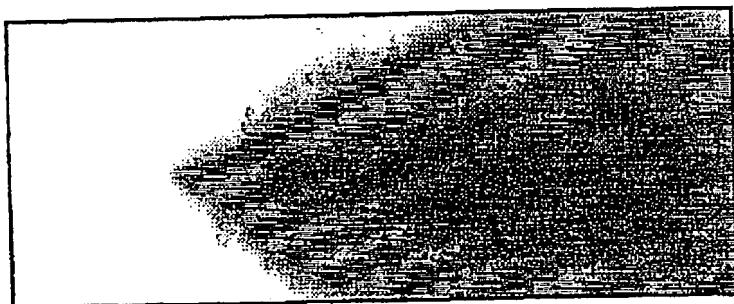


Fig. 6

【図7】

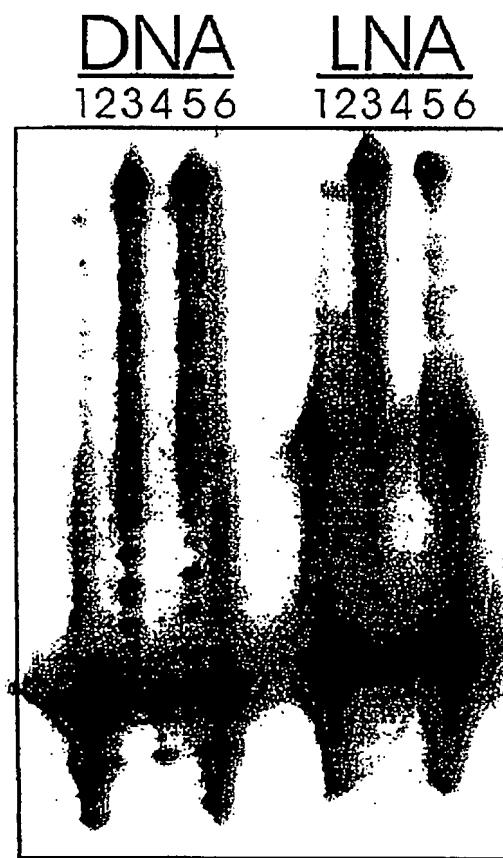
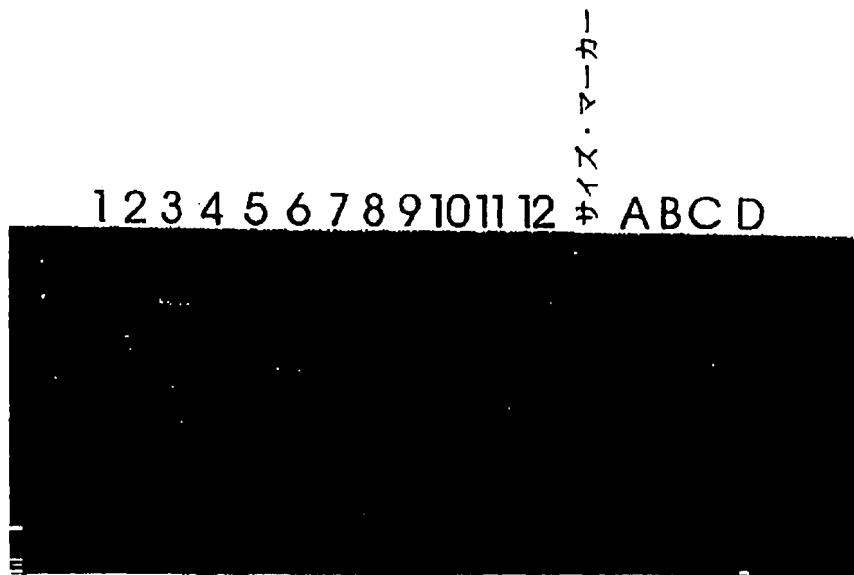


Fig. 7

【図8】



【図9】

• • | ← 25 μM } AQ - DNA  
 • • | ← 12,5 μM }

• • | ← 25 μM } AQ - RNA  
 • • | ← 12,5 μM }

Fig. 9

【図10】

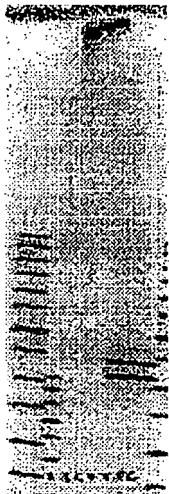
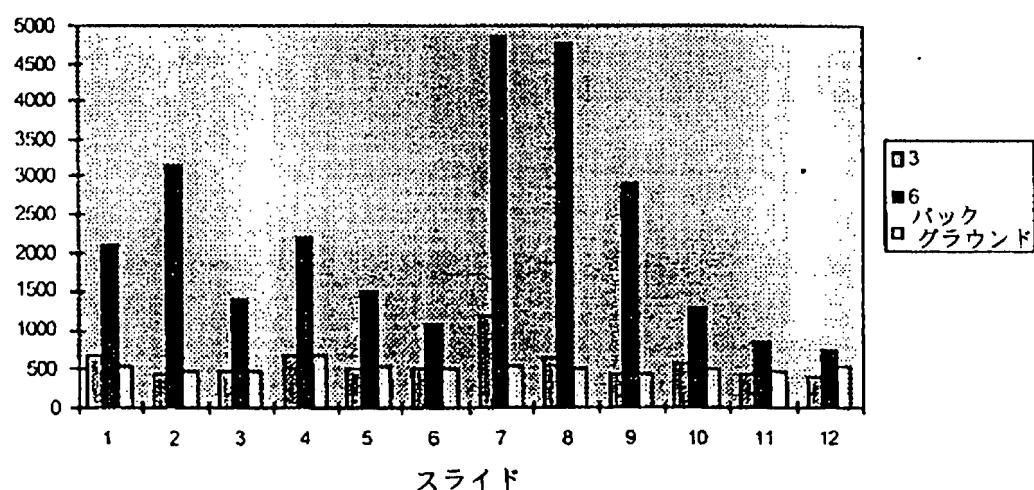


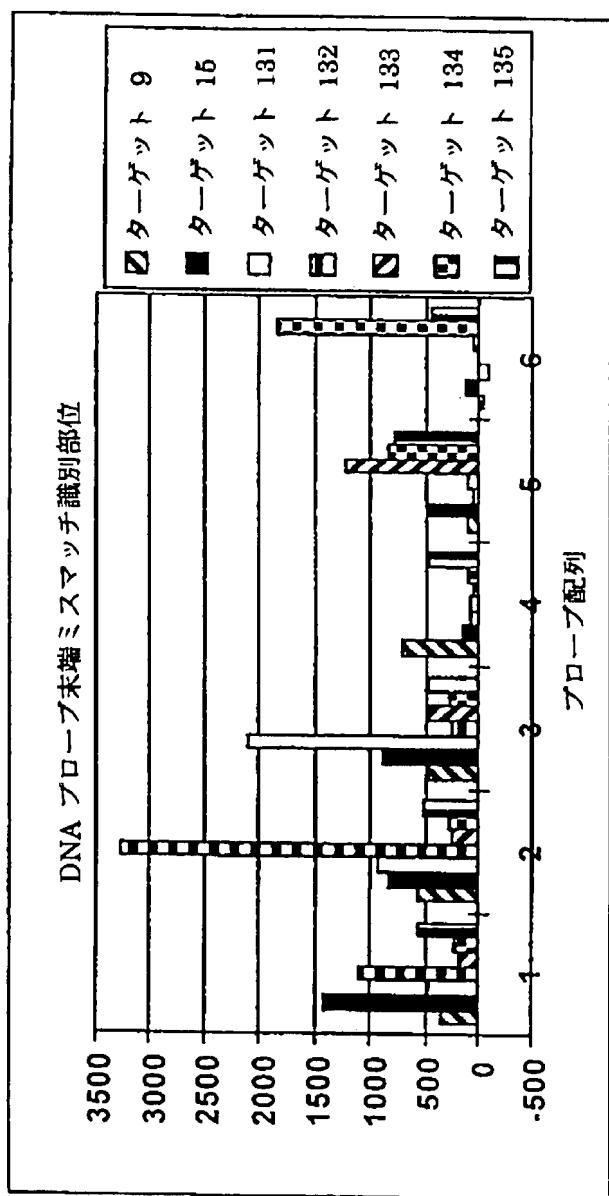
Fig. 10

【図11】

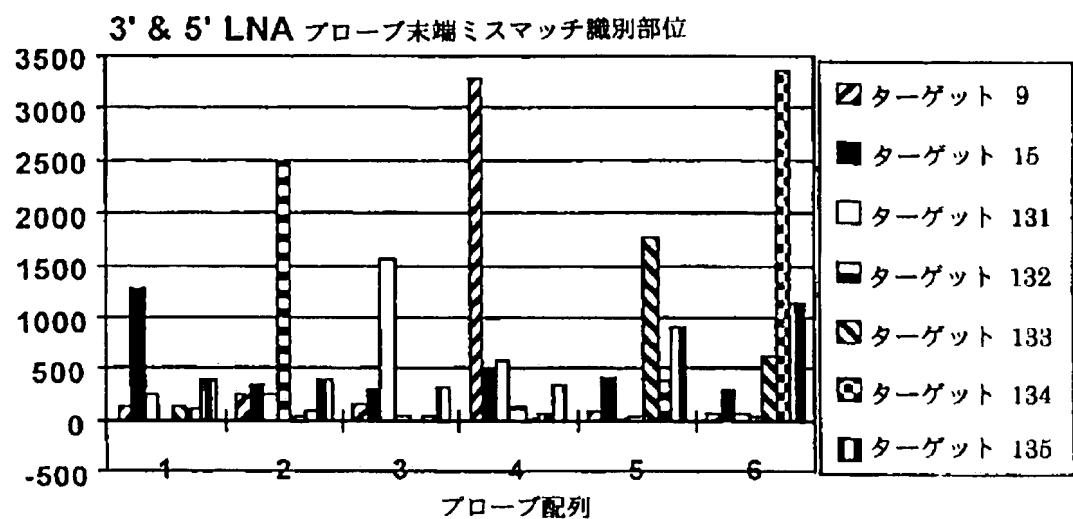
## LNA オリゴ



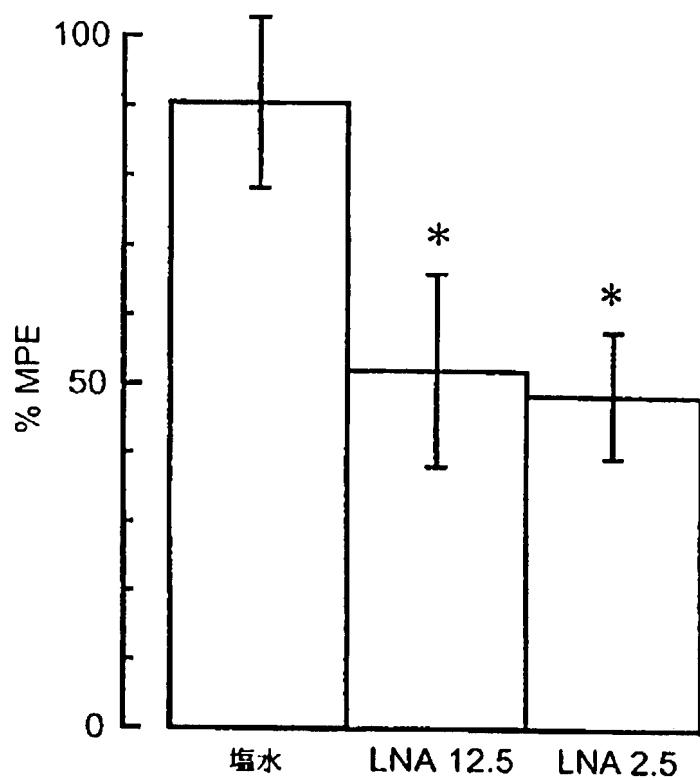
【図12】



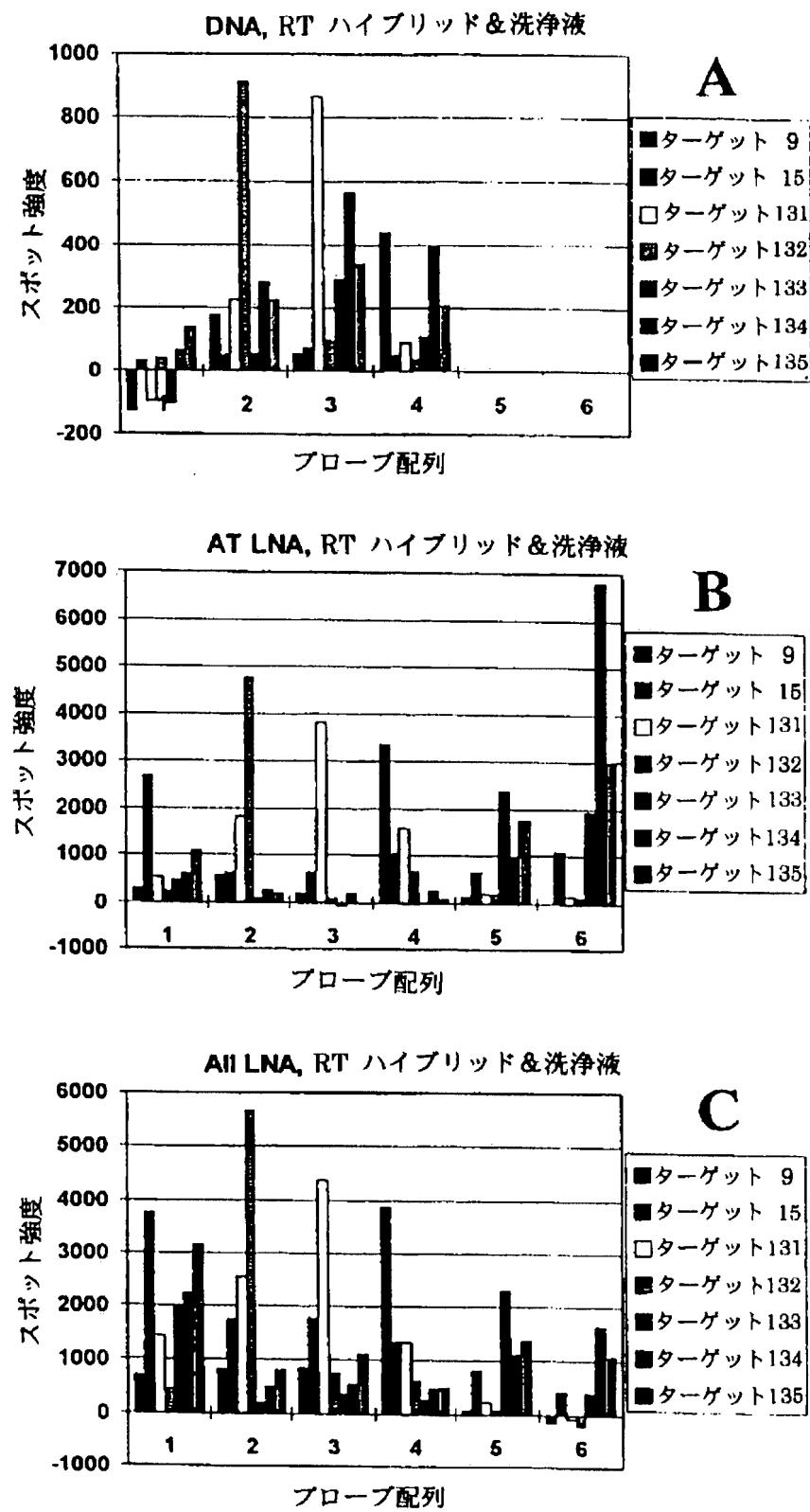
【図13】



【図14】

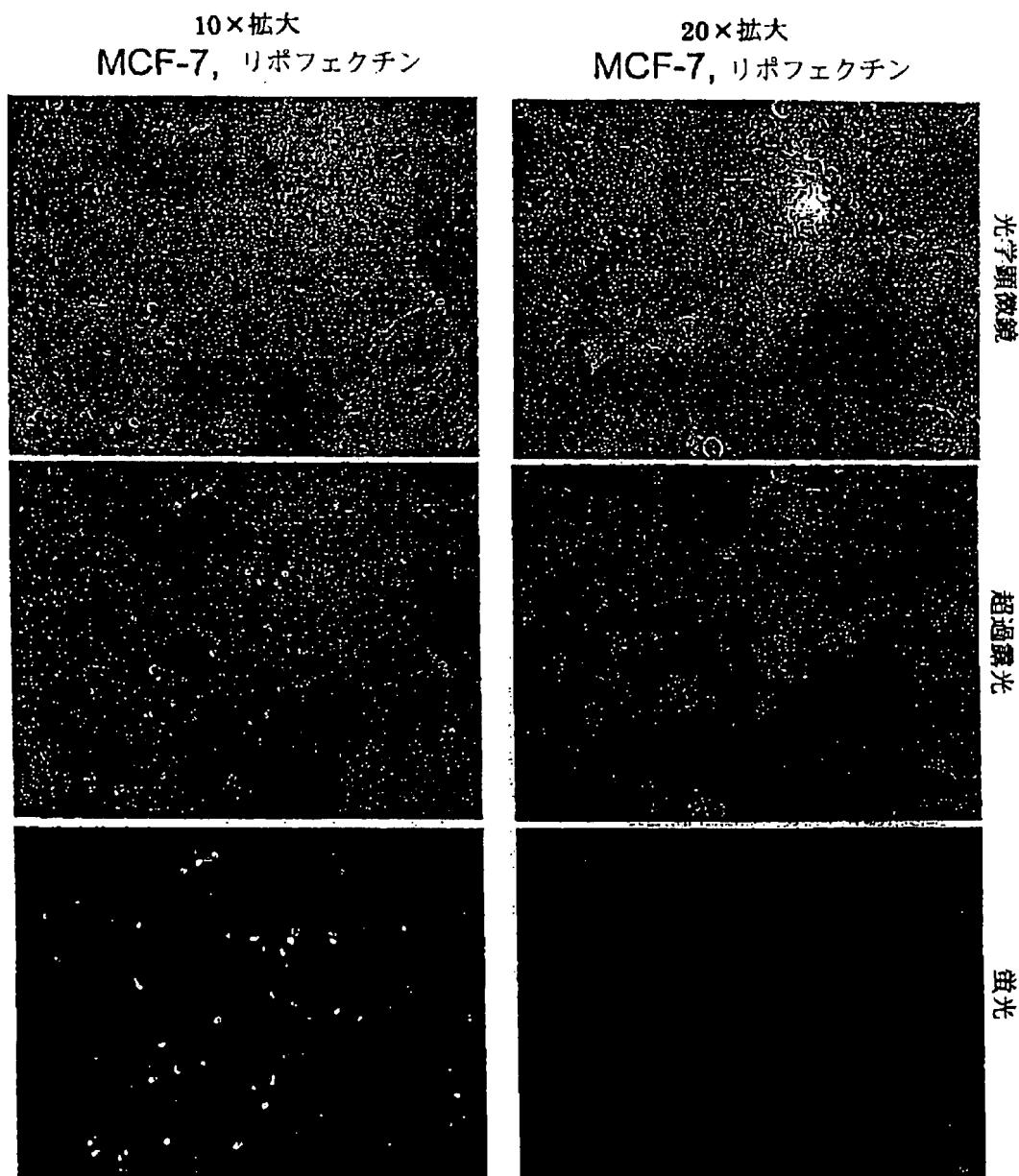


〔圖 15〕



【図16】

#Ina4: FITC-ラベルしたLNA (LA-16)



【図17】

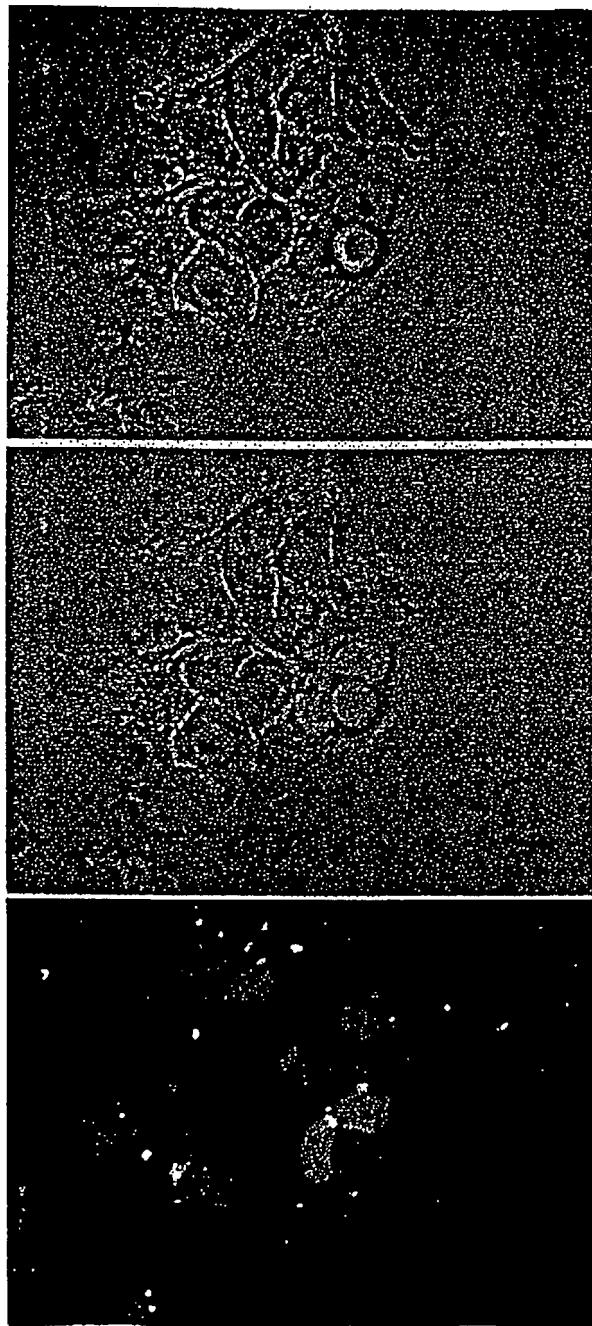


Fig. 17

【図18】

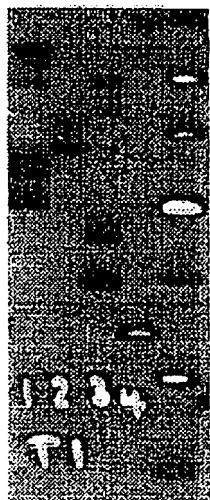


Fig. 18

【図19】



Fig. 19

【図20】

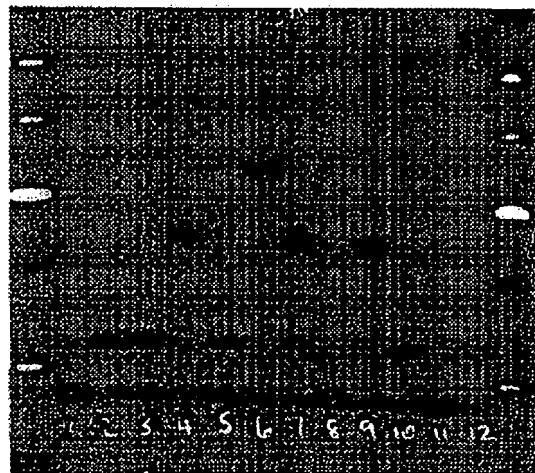


Fig. 20

【図21】

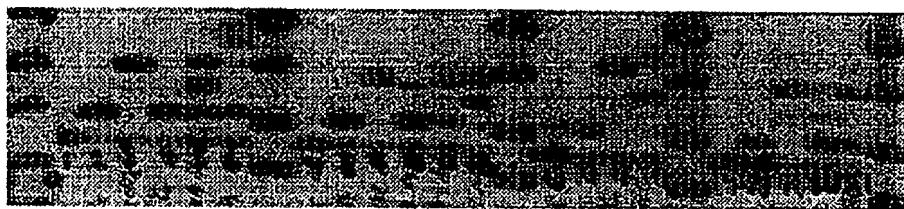


Fig. 21

【図22】

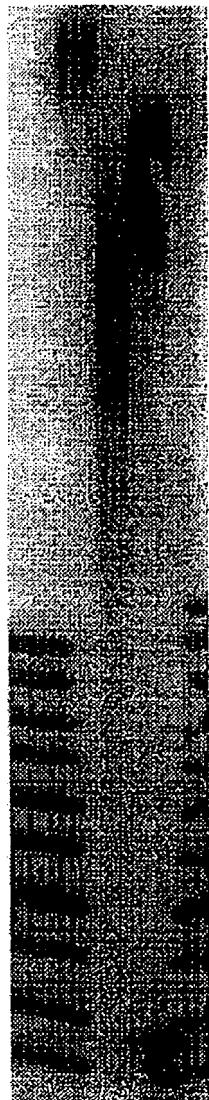
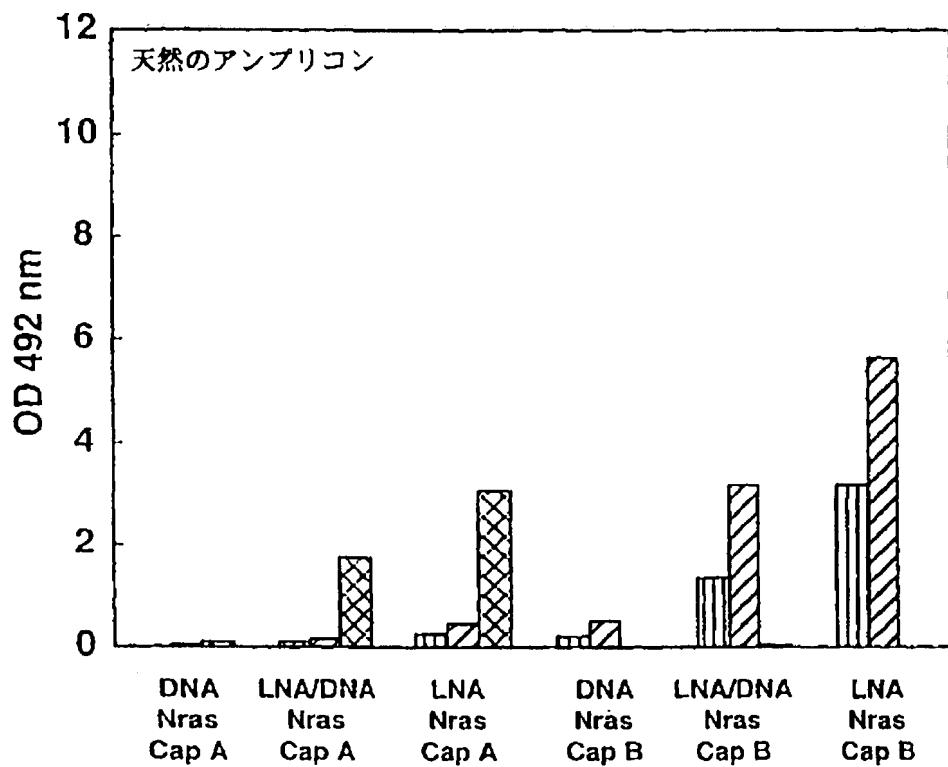
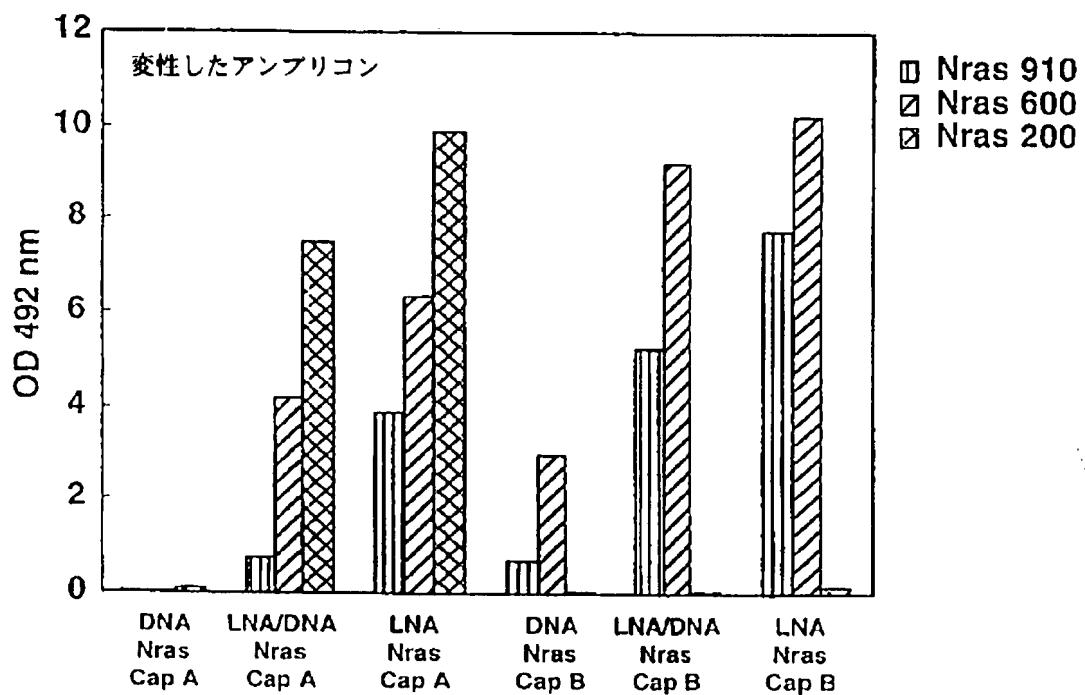


Fig. 22

【図23A】



【図23B】



【図24】

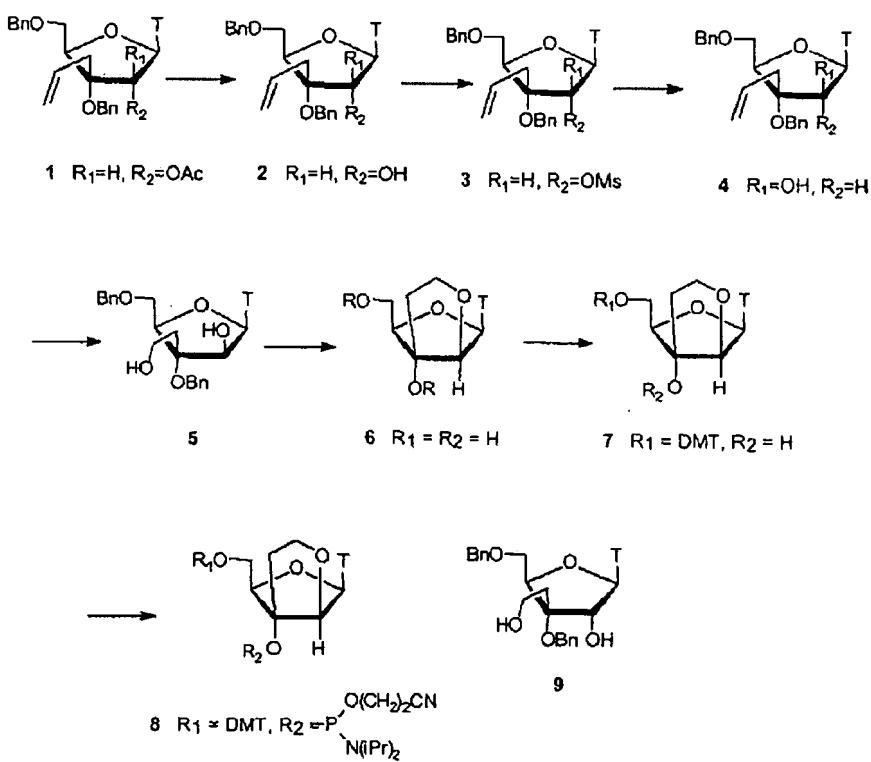


Fig. 24

【図25】

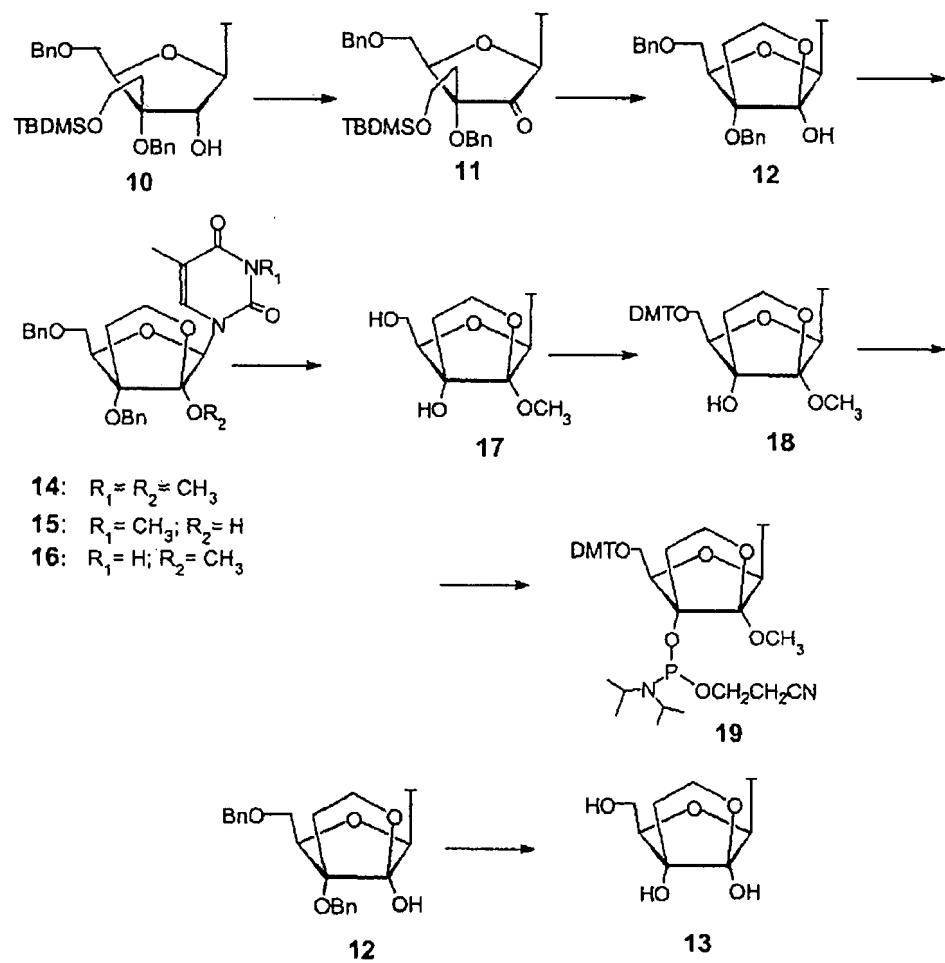


Fig. 25

【図26】

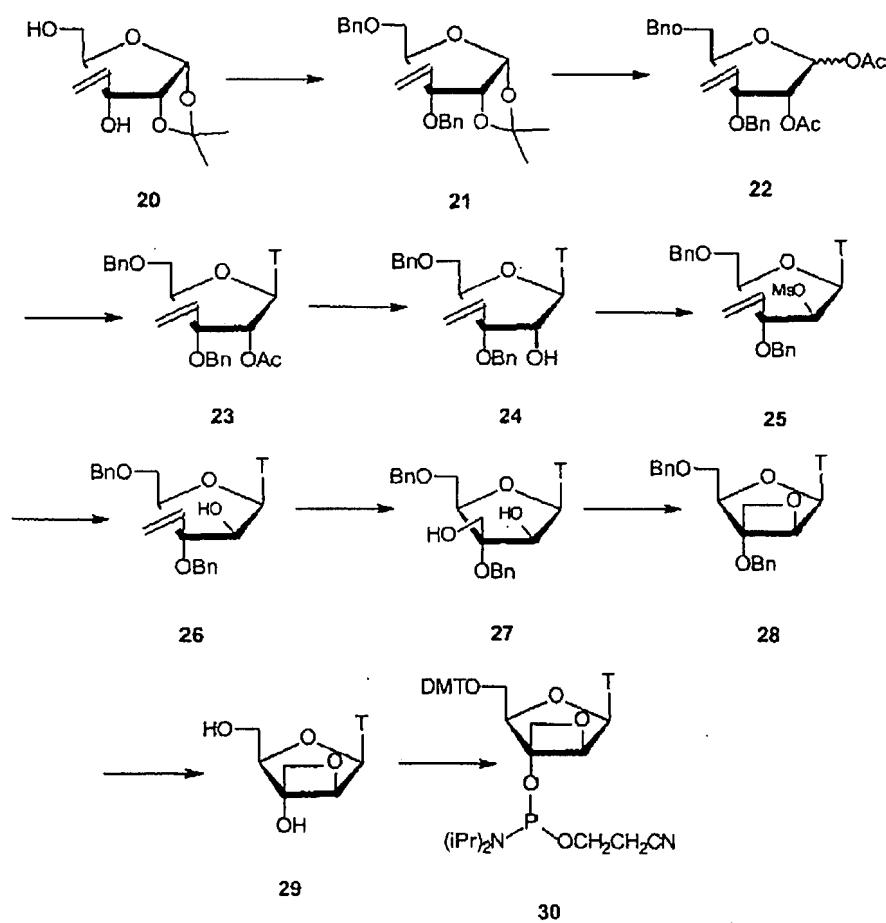


Fig. 26

【図27】

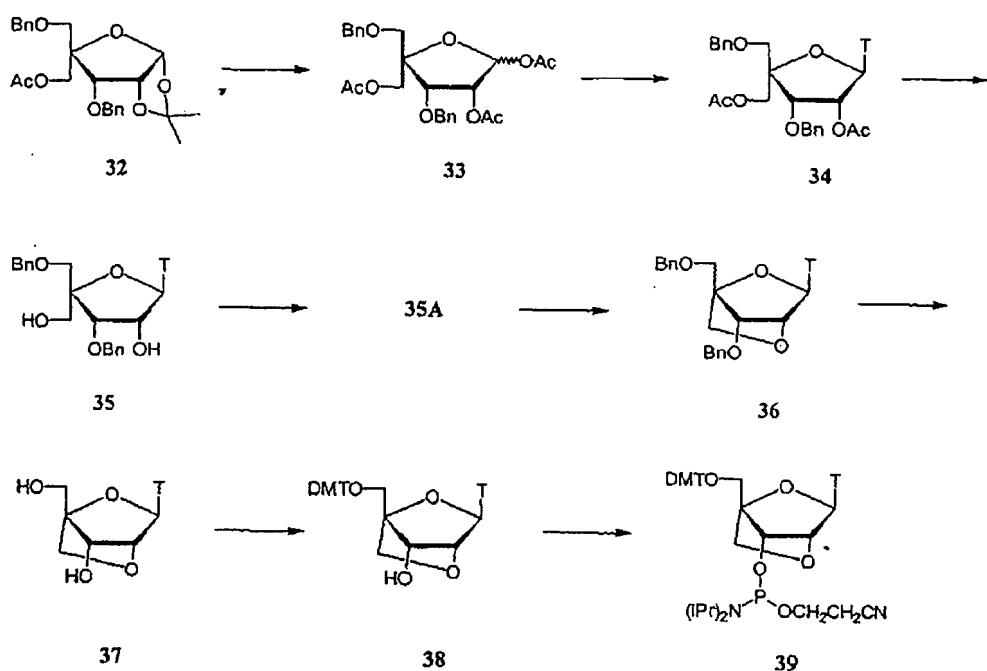


Fig. 27

【図28】

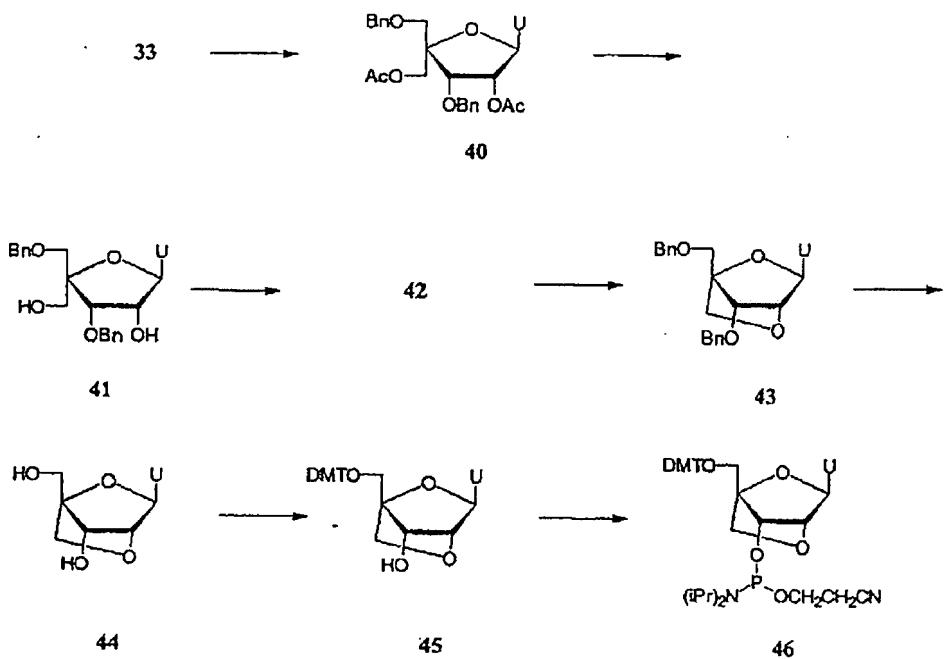


Fig. 28

【図29】

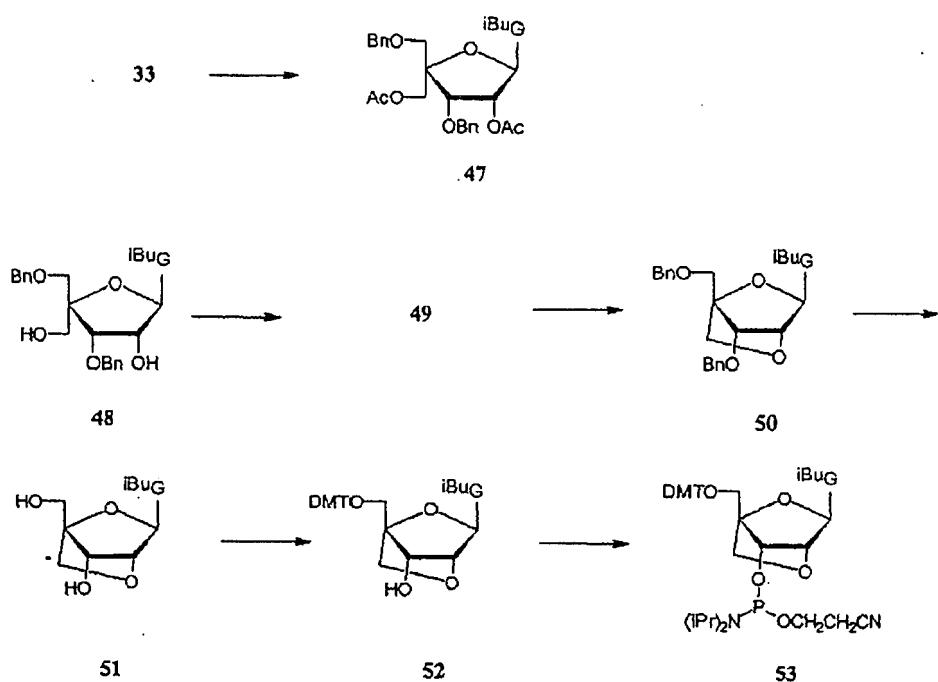


Fig. 29

【図30】

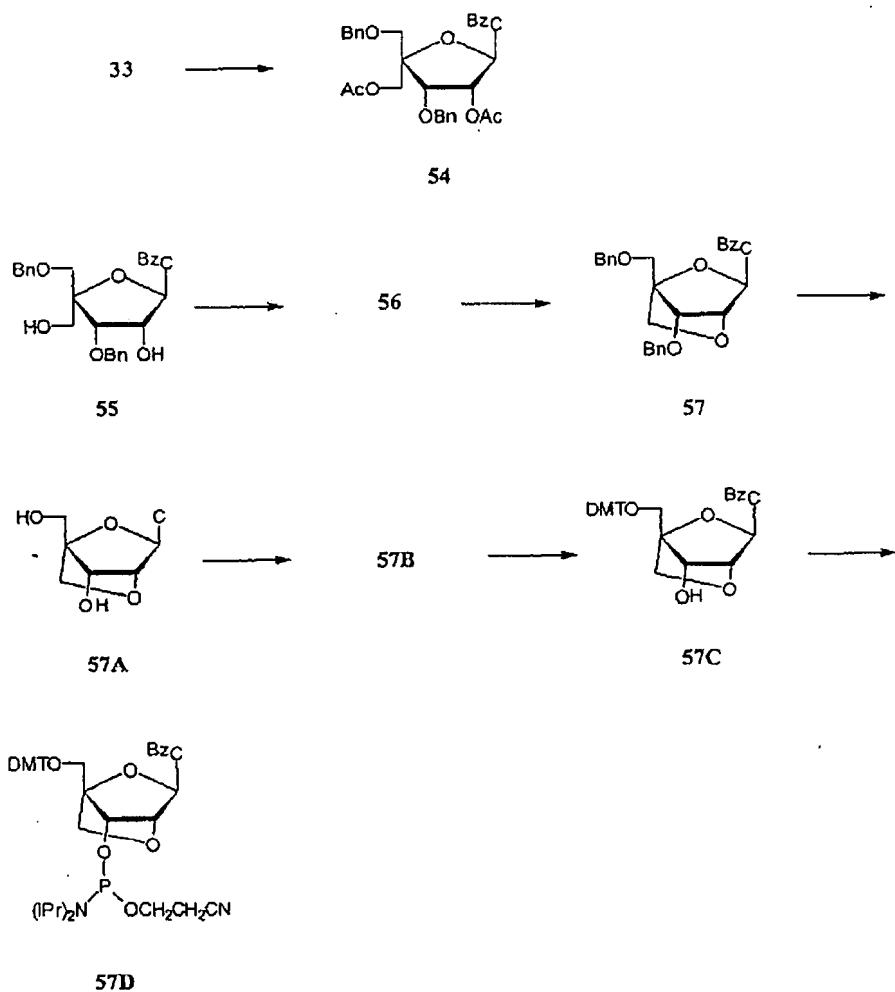


Fig. 30

【図31】

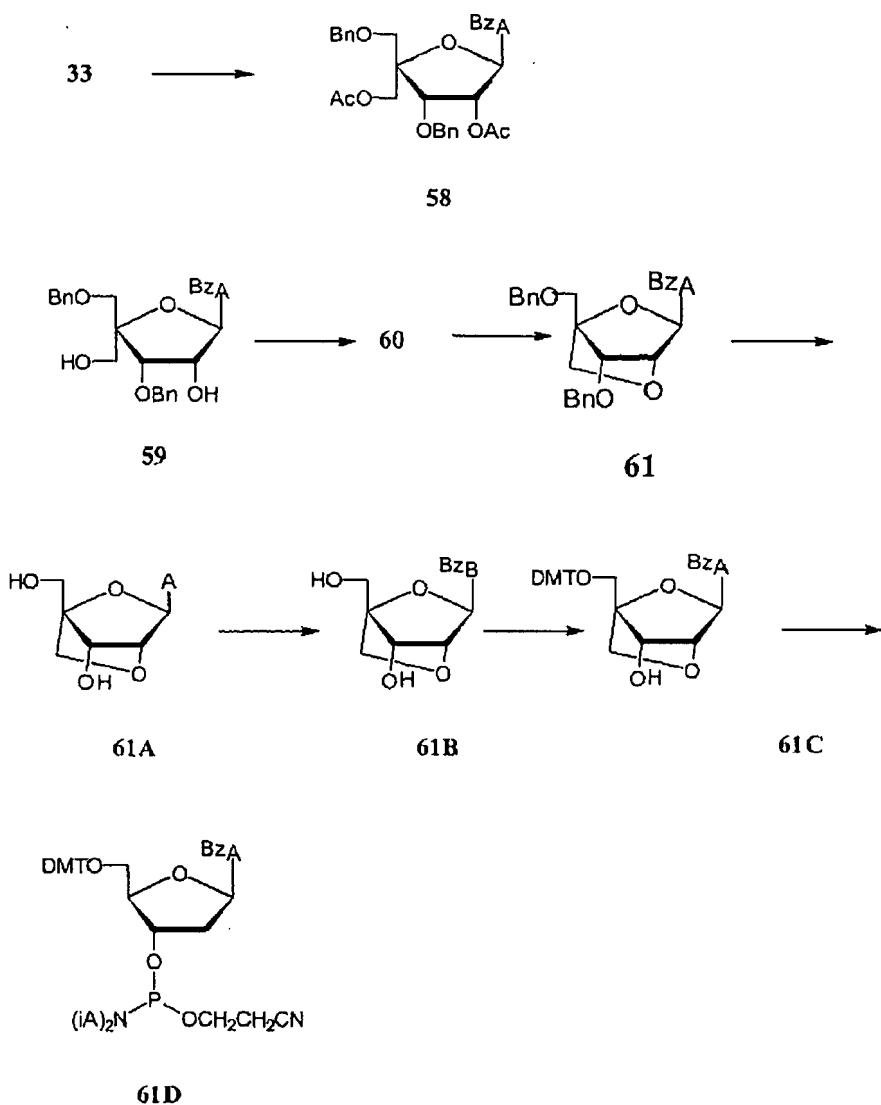


Fig. 31

【図32】

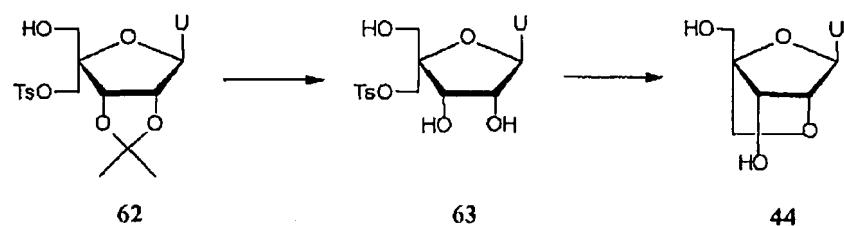


Fig. 32

【図33】

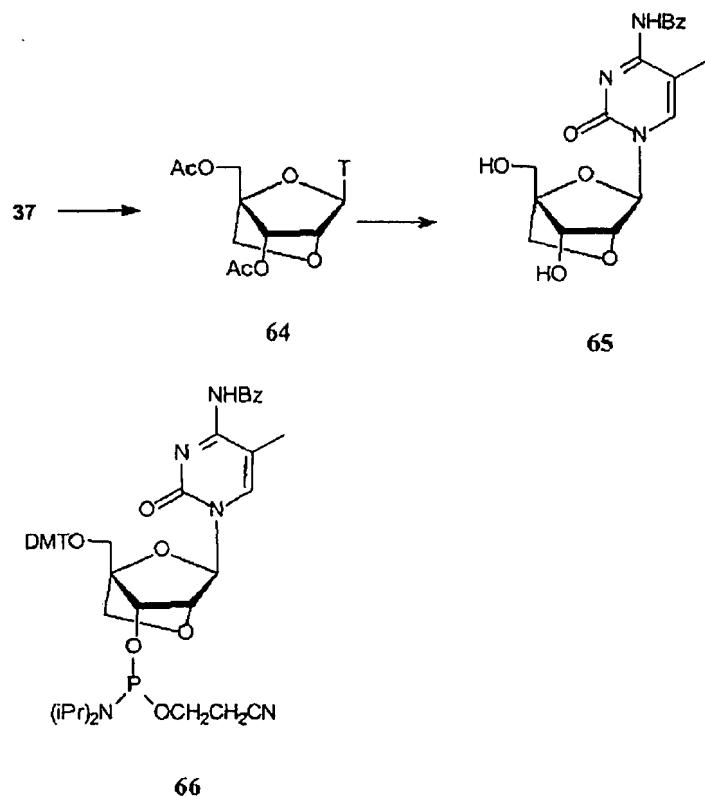


Fig. 33

【図34】

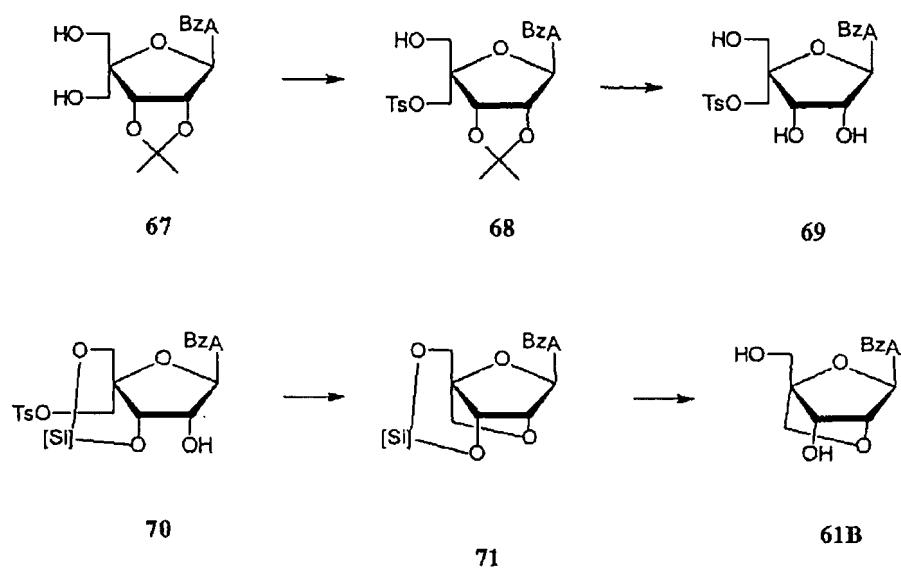
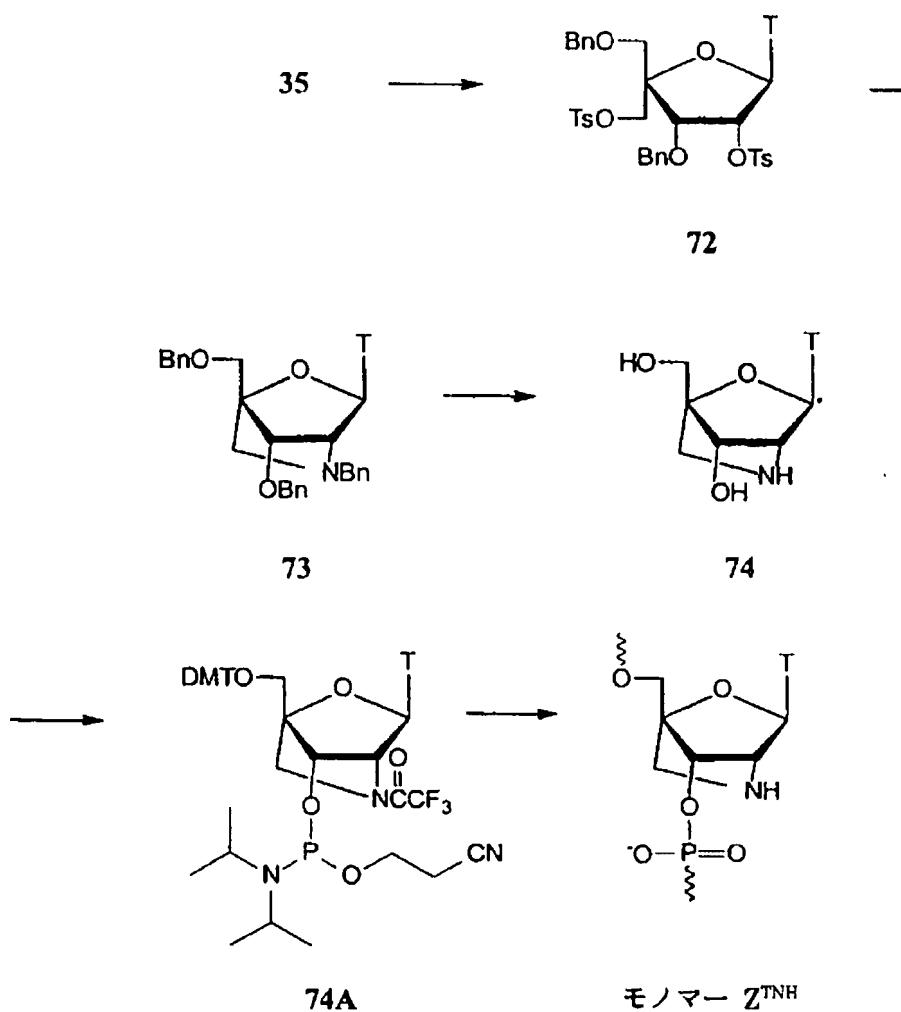
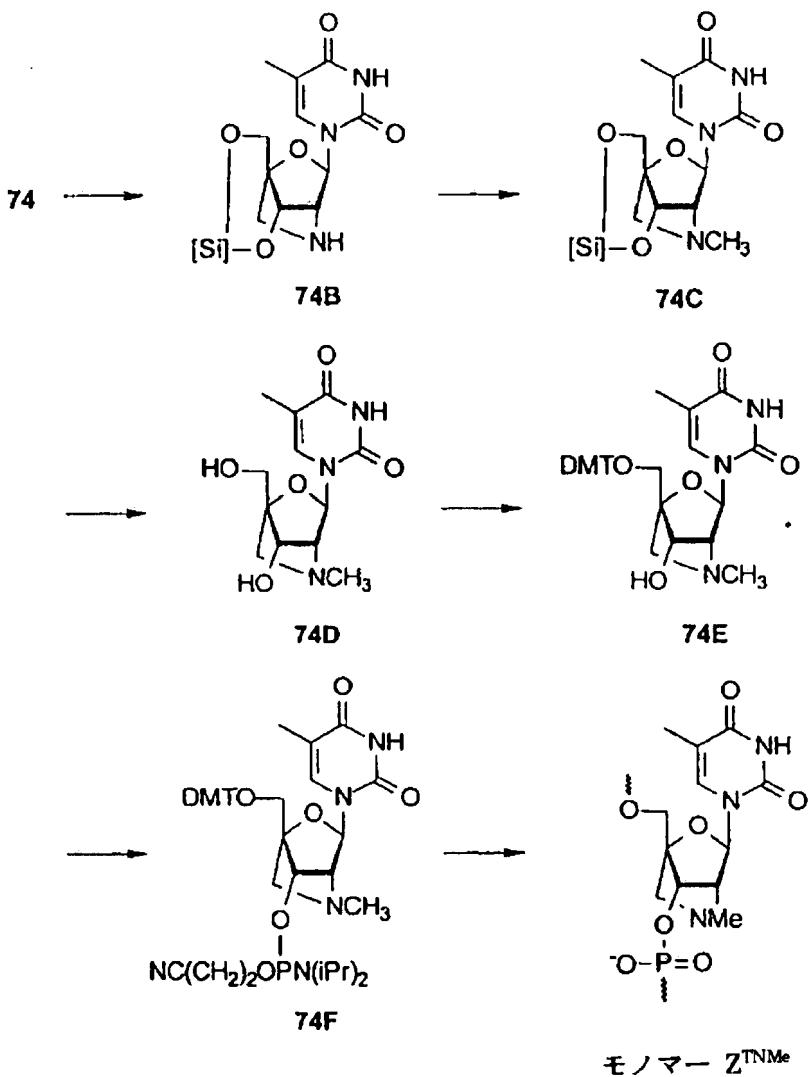


Fig. 34

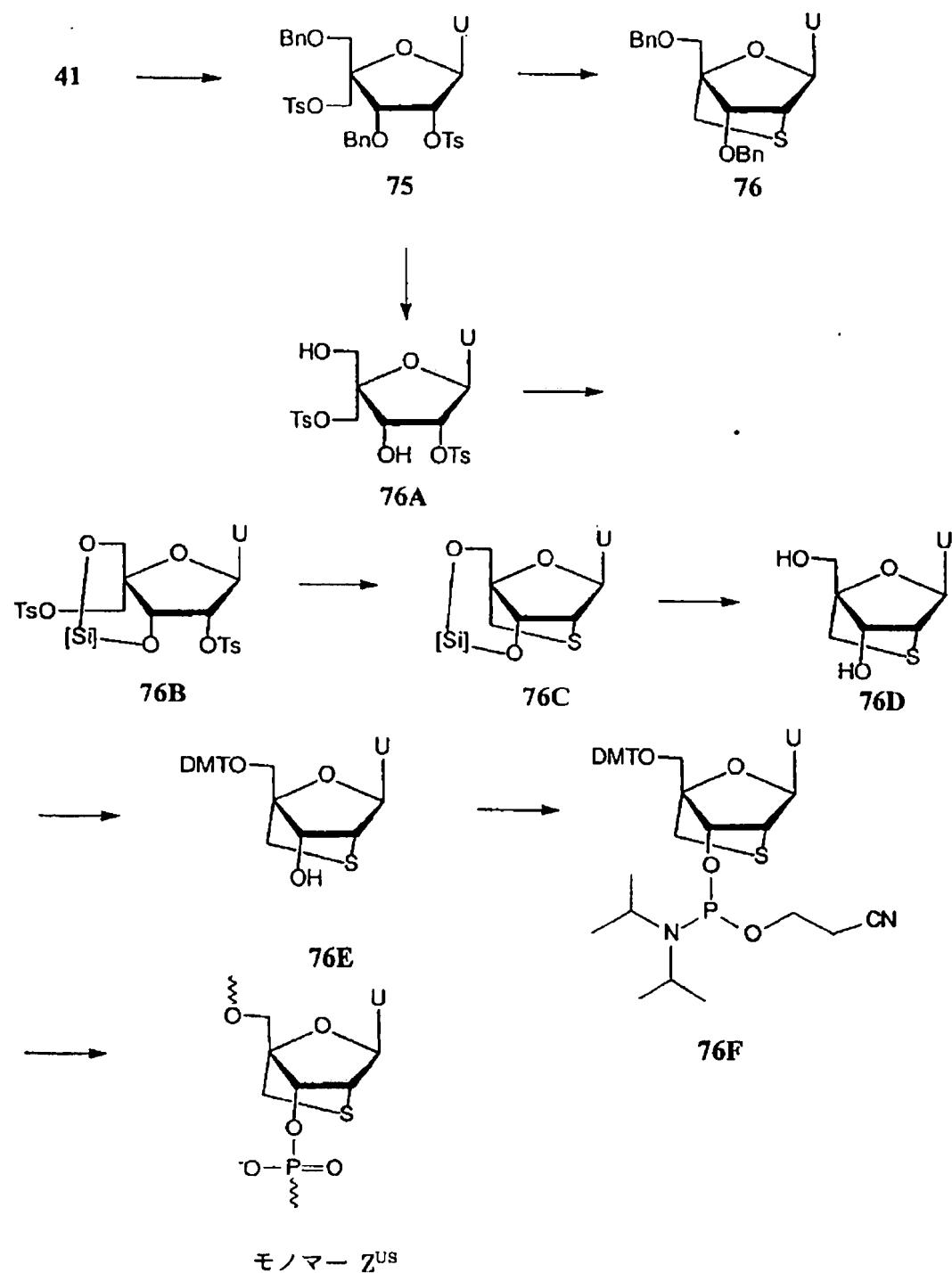
【図35】



【図36】



【図37】

モノマー  $Z^{\text{Us}}$

【図38】

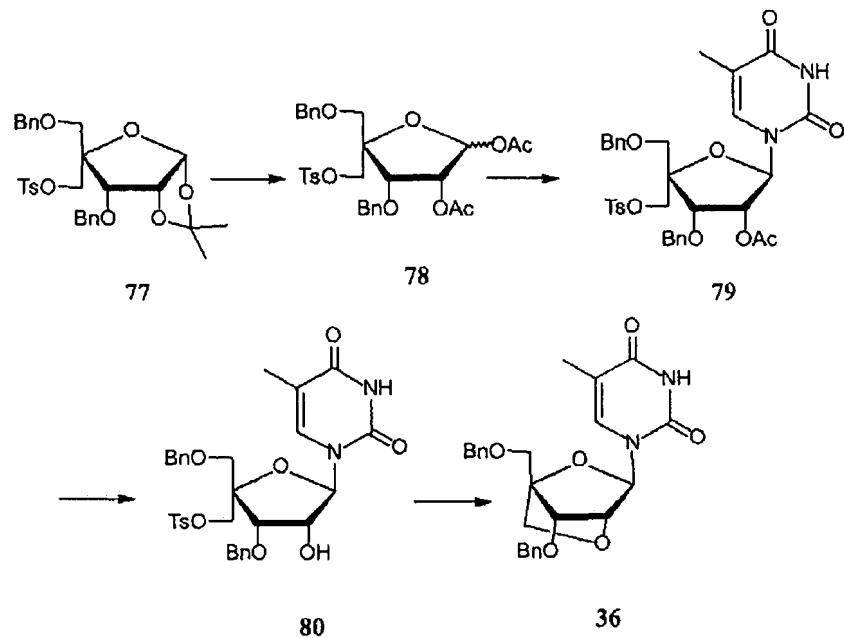


Fig. 38

【図39】

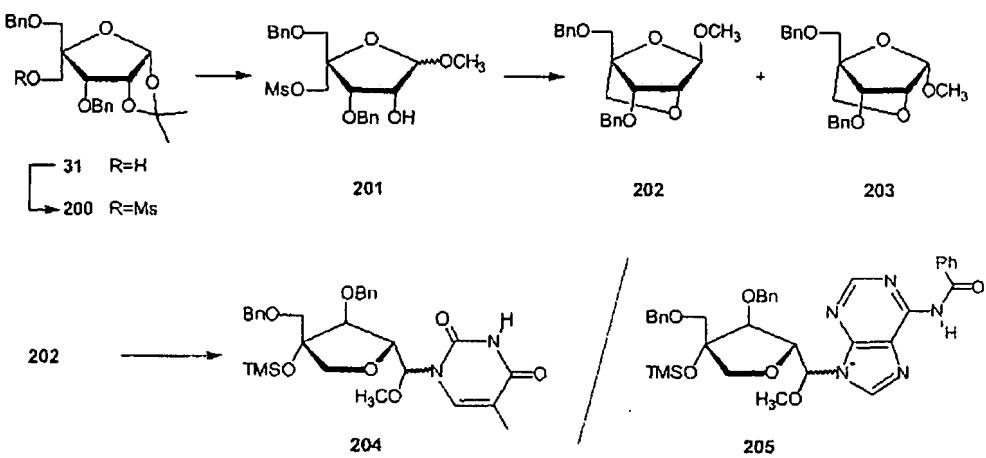


Fig. 39

【図40】

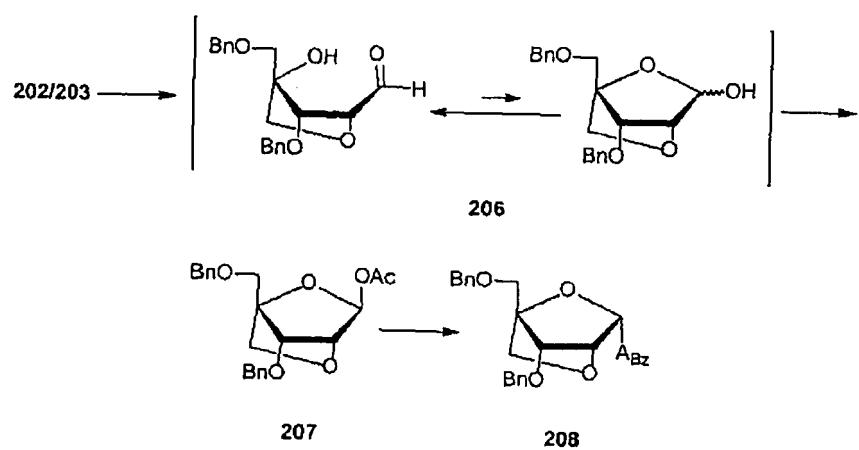


Fig. 40

【図41】

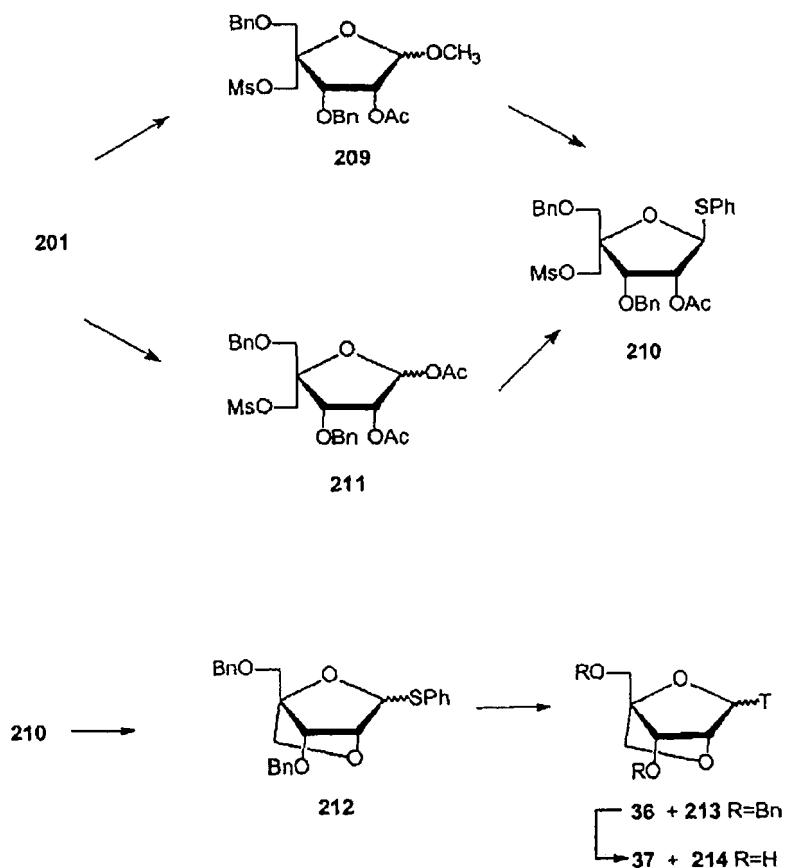


Fig. 41

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International Application No PCT/DK 98/00393						
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 6 C07H19/04 C07H21/00 A61K31/70 C12Q1/68								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> <small>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)</small> IPC 6 C07H A61K C12Q								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)								
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">           P.NIELSEN ET AL.: "A Novel Class of Conformationally Restricted Oligonucleotide Analogues : Synthesis of 2',3'-Bridged Nucleotides and RNA-Selective Hybridisation." JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 9, 7 May 1997, LETCHWORTH GB, pages 825-826, XP002046993 cited in the application see page 825, compounds 5 and x            ---            -/- -         </td> <td style="padding: 2px;">I-75, 80-140</td> </tr> </tbody> </table>			Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	Y	P.NIELSEN ET AL.: "A Novel Class of Conformationally Restricted Oligonucleotide Analogues : Synthesis of 2',3'-Bridged Nucleotides and RNA-Selective Hybridisation." JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 9, 7 May 1997, LETCHWORTH GB, pages 825-826, XP002046993 cited in the application see page 825, compounds 5 and x --- -/- -	I-75, 80-140
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
Y	P.NIELSEN ET AL.: "A Novel Class of Conformationally Restricted Oligonucleotide Analogues : Synthesis of 2',3'-Bridged Nucleotides and RNA-Selective Hybridisation." JOURNAL OF THE CHEMICAL SOCIETY, CHEMICAL COMMUNICATIONS, no. 9, 7 May 1997, LETCHWORTH GB, pages 825-826, XP002046993 cited in the application see page 825, compounds 5 and x --- -/- -	I-75, 80-140						
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.								
<small>* Special categories of cited documents :</small> <ul style="list-style-type: none"> <li><small>*A*</small> document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</li> <li><small>*E*</small> earlier document but published on or after the international filing date</li> <li><small>*L*</small> document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</li> <li><small>*O*</small> document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</li> <li><small>*P*</small> document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</li> </ul> <small>*Y* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</small> <small>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</small> <small>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</small> <small>*a* document member of the same patent family</small>								
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the International search report						
8 March 1999		06.05.1999						
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patenttaunus 2 D-22330 Hamburg Tel: (+49-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl Fax: (+49-70) 340-5016		Authorized officer  SCOTT, J						

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte	nt Application No
PCT/DK 98/00393	

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	V.E.MARQUEZ ET AL.: "Nucleosides with a Twist. Can Fixed Forms of Sugar Ring Pucker Influence Biological Activity in Nucleosides and Oligonucleotides ?" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY., vol. 39, no. 19, 13 September 1996, WASHINGTON US, pages 3739-3747, XP002094300 see the whole document ---	1-75, 80-140
Y	M.BOLLI ET AL.: "Bicyclo-DNA : A Hoogsteen-Selective Pairing System." CHEMISTRY AND BIOLOGY, no. 3, March 1996, pages 197-206, XP002094301 see the whole document	1-75, 80-140
A	C.G.YANNOPoulos ET AL.: "2',3'-Cyclopropanated Nucleoside Dimers." SYNLETT., no. 4, 1997, STUTTGART DE, pages 378-380, XP002046994 cited in the application see the whole document	1
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 70, no. 1, 6 January 1969 Columbus, Ohio, US; abstract no. 3737b, G.ZIGEUNER ET AL.: "Heterocycles. XVI. 1,4-Dimethyl-3-acetoxy-7-acetamido-2-oxabi cyclo(2.2.1)heptane." page 343; column 1; XP002046995 see abstract & MONATSCH. CHEM., vol. 99, no. 5, 1968, pages 2111-2120,	1
P,X	R.KUMAR ET AL.: "The first Analogues of LNA (Locked Nucleic Acids) : Phosphorothioate-LNA and 2'-Thio-LNA." BIOORGANIC AND MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, no. 8, 1998, pages 2219-2222, XP002094302 see the whole document	1-75, 80-140
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DK 98/00393

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	S.K.SINGH ET AL.: "LNA (Locked Nucleic Acids) : Synthesis and High-Affinity Nucleic Acid Recognition." CHEMICAL COMMUNICATIONS., no. 4, 21 February 1998, CIETY OF CHEMISTRY GB, pages 455-456, XP002094303 see the whole document	1-75, 80-140
P,X	A.A.KOSHKIN ET AL.: "LNA (Locked Nucleic Acids) : Synthesis of the Adenine, Cytosine, Guanine, 5-Methylcytosine, Thymine and Uracil Bicyclonucleoside Monomers, Oligomerisation, and the Unprecedented Nucleic Acid Recognition." TETRAHEDRON, vol. 54, 1998, pages 3607-3630, XP002094304 see the whole document	1-75, 80-140
T	P.HERDEWIJN: "Targeting RNA with Conformationally Restricted Oligonucleotides." LIEBIGS ANNALEN: ORGANIC AND BIOORGANIC CHEMISTRY., no. 9, September 1996, ISHERS US, pages 1337-1348, XP002094305 see the whole document	1

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	In. International application No. PCT/DK 98/00393
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</li>     <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:</li>     <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:</p> <p style="text-align: center;">see additional sheet</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</li>   <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</li>   <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li>     <li>4. <input checked="" type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</li> </ol> <p style="text-align: center;">1-75, 80-140 partially</p>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

International Application No. PCT/DK 98/00393

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/IBA/ 210****1. Claims: 1-75,80-140 partially**

A nucleoside with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 2' and 4'positions (LNA); oligomers containing these LNAs; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

**2. Claims: 1-28,43-68,76-82,93-140 partially**

A nucleoside with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 2' and 3'positions (LNA); oligomers containing these LNAs; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

**3. Claims: 1-28,43-68,93-140 partially**

A nucleoside with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 3' and 4'positions (LNA); oligomers containing these LNAs; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

**4. Claims: 1-28,43-68,93-140 partially**

A nucleoside with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 3' and 5'positions (LNA); oligomers containing these LNAs; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

**5. Claims: 1-28,43-68,93-140 partially**

A nucleoside with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 1' and 4'positions (LNA); oligomers containing these LNAs; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

**6. Claims: 1-28,43-68,93-140 partially**

A nucleoside with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 1' and 2'positions (LNA); oligomers containing these LNAs; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

International Application No. PCT/DK 98/00393

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 7. Claims: 1-140 partially

A nucleoside with two pairs of geminal substituents forming a biradical (LNA); oligomers containing these LNAs; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

## 8. Claims: 1-11,39-59,97,103,105-140 partially

Oligomers containing LNAs with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 1' and 5' positions; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

## 9. Claims: 1-11,39-59,97,103,105-140 partially

Oligomers containing LNAs with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 1' and 3' positions; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

## 10. Claims: 1-11,39-59,97,103,105-140 partially

Oligomers containing LNAs with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 2' and 5' positions; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

## 11. Claims: 1-11,39-59,97,103,105-140 partially

Oligomers containing these LNAs with one pair of geminal substituents forming a biradical between the 4' and 5' positions; uses of both the LNA and the oligomer containing the LNA; conjugates of the oligomer; solid surfaces with LNA or oligomers containing them.

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マーク(参考)
C 0 7 D 491/08 493/04 493/08	1 0 1	C 0 7 D 491/08 493/04 493/08	4 C 0 8 6 4 H 0 4 9 A 4 H 0 5 0
C 0 7 F 7/18		C 0 7 F 7/18	T
C 0 7 H 19/06 19/16 21/00		C 0 7 H 19/06 19/16 21/00	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	A
(31)優先権主張番号	0 0 6 1 / 9 8		
(32)優先日	平成10年1月16日(1998. 1. 16)		
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)		
(31)優先権主張番号	0 2 8 6 / 9 8		
(32)優先日	平成10年3月3日(1998. 3. 3)		
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)		
(31)優先権主張番号	0 5 8 5 / 9 8		
(32)優先日	平成10年4月29日(1998. 4. 29)		
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)		
(31)優先権主張番号	6 0 / 0 8 8 , 3 0 9		
(32)優先日	平成10年6月5日(1998. 6. 5)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)優先権主張番号	P A 1 9 9 8 0 0 7 5 0		
(32)優先日	平成10年6月8日(1998. 6. 8)		
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)		
(31)優先権主張番号	P A 1 9 9 8 0 0 9 8 2		
(32)優先日	平成10年7月28日(1998. 7. 28)		
(33)優先権主張国	デンマーク(DK)		
(81)指定国	E P (A T, B E, C H, C Y, D E, D K, E S, F I, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E), O A (B F, B J , C F, C G, C I, C M, G A, G N, G W, M L, M R, N E, S N, T D, T G), A P (G H, G M, K E, L S, M W, S D, S Z, U G, Z W), E A (A M , A Z, B Y, K G, K Z, M D, R U, T J, T M) , A L, A M, A T, A U, A Z, B A, B B, B G, B R, B Y, C A, C H, C N, C U, C Z, D E, D K, E E, E S, F I, G B, G E, G H, G M, H R , H U, I D, I L, I S, J P, K E, K G, K P, K R, K Z, L C, L K, L R, L S, L T, L U, L V, M D, M G, M K, M N, M W, M X, N O, N Z , P L, P T, R O, R U, S D, S E, S G, S I, S K, S L, T J, T M, T R, T T, U A, U G, U S, U Z, V N, Y U, Z W		
(71)出願人	B y g s t u b b e n 9, D K - 2950 V e d b a e k D E N M A R K		

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA80 HA11 HA17  
4B063 QA01 QA13 QA18 QQ42 QQ53  
QR55 QR62 QX01  
4C057 BB02 BB05 DD01 LL10 LL18  
LL21 LL29 MM01 MM04 MM05  
MM09  
4C071 AA01 AA03 BB01 CC12 EE03  
EE05 FF15 HH05 JJ05 LL01  
4C084 AA13 CA53 CA56 CA59 NA05  
NA14 ZB262 ZB332  
4C086 AA01 AA04 EA16 NA14 ZB26  
ZB33  
4H049 VN01 VP01 VQ59 VR23 VR41  
VU06 VW01  
4H050 AA01 AA03 AB20 AB28 AB29